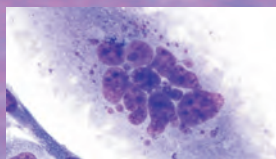
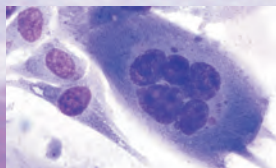
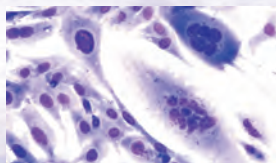


# Untersuchungen zur Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen an feline(n)n Vakzinationsstellen-assoziierten Sarkomen in vivo und in vitro

Corinna Löhberg-Grüne



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

---

Untersuchungen zur Transkription von Wachstumsfaktoren und  
Zytokinen an felineen Vakzinationsstellen-assoziierten Sarkomen in vivo  
und in vitro

---

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des  
Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

CORINNA LÖHBERG-GRÜNE

Tierärztin aus Mettmann

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2010

Meiner Mutter



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Vakzinationsstellen-assoziiertes Sarkom (VAS) als Sonderfall des Fibrosarkoms bei der Katze.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologie.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>Morphologie .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4</b>	<b>Pathogenese.....</b>	<b>7</b>
2.4.1	VAS und Entzündung.....	7
2.4.2	Genetische Veränderungen.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial .....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Tumoren .....	24
3.1.2	Zelllinien .....	27
3.1.3	Kontrollen.....	31
<b>3.2</b>	<b>Immunhistologie/Immunzytologie .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Nachweis von FeLV-Antigenen.....	34
3.2.2	Nachweis von $\alpha$ -smooth muscle actin .....	35
3.2.3	Nachweis von Vimentin .....	36
3.2.4	Nachweis von Desmin.....	37
3.2.5	Nachweis von Zytokeratin.....	39
3.2.6	Nachweis von MHC II.....	40
3.2.7	Immunhistologische Kontrollen .....	41
3.2.8	Auswertung der Immunhistologie/Immunzytologie.....	41
<b>3.3</b>	<b>Enzymhistochemie/Enzymzytochemie .....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase .....	42
3.3.2	Enzymhistochemische Kontrolle .....	43
3.3.3	Auswertung der Enzymhistochemie/Enzymzytochemie .....	43

<b>3.4</b>	<b>Chromosomenanalyse .....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Vorbereitung der Kulturen .....	43
3.4.2	Chromosomenpräparation .....	44
3.4.3	Auswertung der Chromosomenanalyse .....	45
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung auf FeLV mit PCR.....</b>	<b>45</b>
3.5.1	DNS-Extraktion aus Gewebe.....	45
3.5.2	DNS-Extraktion aus kultivierten Zellen .....	46
3.5.3	Durchführung der PCR.....	46
3.5.4	Detektion des PCR-Produkts mittels Elektrophorese .....	47
3.5.5	Kontrollen für die PCR.....	48
<b>3.6</b>	<b>Ermittlung einer Teilsequenz für felines FGF-2 .....</b>	<b>48</b>
3.6.1	Vorbereitung der Proben .....	49
3.6.2	RNS-Extraktion .....	49
3.6.3	DNase-Behandlung.....	50
3.6.4	RT-Reaktion .....	50
3.6.5	Entwicklung der Primer.....	51
3.6.6	PCR-Ansatz .....	52
3.6.7	PCR-Ablauf .....	52
3.6.8	Detektion des PCR-Produkts mittels Elektrophorese .....	52
3.6.9	Klonierung des PCR-Produkts.....	53
<b>3.7</b>	<b>Etablierung von TaqMan-Real-Time-PCR-Systemen zum Nachweis der Transkription von feline EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2.....</b>	<b>58</b>
3.7.1	Entwicklung der TaqMan-Primer und -Sonden.....	58
3.7.2	Testen der Primer .....	59
3.7.3	Optimierung der Real-Time PCR .....	62
3.7.4	Bestimmung der Effizienzen der TaqMan-Real-Time-PCR-Systeme zum Nachweis der Transkription von feline EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2 .....	62
<b>3.8</b>	<b>TaqMan-Systeme für felines IL-1, felines TNF und feline GAPDH .....</b>	<b>63</b>
<b>3.9</b>	<b>Untersuchung von Tumoren und Zelllinien auf die Transkription von feline IL-1, TNF, EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2.....</b>	<b>63</b>
3.9.1	RNS-Extraktion aus Gewebe.....	64
3.9.2	RNS-Extraktion aus Zellen.....	64
3.9.3	Herstellung der cDNS.....	65
3.9.4	Quantifizierung der Wachstumsfaktor- und Zytokin-Transkription in Tumoren und Zelllinien im Vergleich zur Transkription in Unterhaut und kultivierten Hautfibroblasten.....	65



<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Tumoren .....</b>	<b>67</b>
4.1.1	Vorbericht.....	67
4.1.2	Makroskopische Befunde .....	68
4.1.3	FeLV-Status.....	68
4.1.4	Histopathologische Befunde.....	68
4.1.5	Auswertung der Gefrierschnitte.....	70
4.1.6	Ergebnisse der Immunhistologie .....	70
4.1.7	Ergebnisse der Enzymhistochemie .....	71
<b>4.2</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Morphologie und Verhalten in Gewebekultur .....	71
4.2.2	Zytologische Befunde.....	72
4.2.3	Immunzytologische Befunde.....	73
4.2.4	Enzymzytochemische Befunde.....	73
4.2.5	Rasterelektronenmikroskopische Befunde .....	73
4.2.6	Auswertung der Chromosomenanalyse .....	73
<b>4.3</b>	<b>Kontrollen .....</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Ermittelte Teilsequenz für felines FGF-2 und Primer-Sonden-System .....</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Spezifität der TaqMan-Primer und -Sonden für felines EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2 .....</b>	<b>77</b>
<b>4.6</b>	<b>Optimierung der TaqMan-Real-Time PCR .....</b>	<b>78</b>
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung der Effizienz der Systeme für EGF, FGF-2, PDGF und TGFβ1.....</b>	<b>80</b>
<b>4.8</b>	<b>Bestimmung der Transkription von EGF, FGF-2, PDGF, TGFβ1, TNF und IL-1 in Tumoren und Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen.....</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1</b>	<b>Tumoren.....</b>	<b>86</b>
5.1.1	Epidemiologie .....	86
5.1.2	FeLV-Status/Histologie/Immunhistologie.....	87
<b>5.2</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>94</b>
<b>5.3</b>	<b>Kontrollen .....</b>	<b>97</b>
<b>5.4</b>	<b>Untersuchung auf die Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen.....</b>	<b>99</b>

5.4.1	Anwendung der komparativen C <sub>T</sub> -Methode mit GAPDH als „housekeeping“ Gen.....	99
5.4.2	Transkription von EGF, FGF-2, PDGF, TGFβ1, TNF und IL-1 in VAS, Zelllinien und Kontrollen .....	102
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>6.1</b>	<b>Summary .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>TABELLEN .....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGEN .....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>BEZUGSQUELLEN .....</b>	<b>138</b>
<b>10.1</b>	<b>Bezugsquellen für Antikörper, Chemikalien, Enzyme und Kits .....</b>	<b>138</b>
<b>10.2</b>	<b>Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel .....</b>	<b>142</b>
<b>11</b>	<b>LÖSUNGEN UND PUFFER.....</b>	<b>147</b>
<b>11.1</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>147</b>
<b>11.2</b>	<b>Chromosomenpräparation .....</b>	<b>147</b>
<b>11.3</b>	<b>Immunhistologie .....</b>	<b>148</b>
<b>11.4</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie .....</b>	<b>149</b>
<b>11.5</b>	<b>PCR.....</b>	<b>150</b>
<b>11.6</b>	<b>Elektrophorese.....</b>	<b>150</b>
<b>11.7</b>	<b>Klonierung .....</b>	<b>151</b>
<b>12</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>152</b>
<b>13</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>156</b>
<b>14</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>158</b>
<b>15</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>160</b>

# 1 Einleitung

Feline Vakzinationsstellen-assoziierte Sarkome (VAS) sind mesenchymale Tumoren, die bei Katzen an den Lokalisationen auftreten, die von Tierärzten bevorzugt für Impfungen benutzt werden. Die häufigste Form ist das in der Klassifikation der World Health Organisation (WHO) für mesenchymale Tumoren beschriebene Feline Postvakzinale Fibrosarkom (1998). Es handelt sich nach der Definition der WHO um einen aggressiven, häufig rezidivierenden Tumor aus Fibroblasten, der an Impfstellen bei Katzen auftritt. Neben Fibrosarkomen treten an Impfstellen aber auch Osteosarkome, Chondrosarkome, Hämangiosarkome, Myxosarkome, Rhabdomyosarkome oder maligne fibröse Histiozytome auf (Doddy et al., 1996; Esplin et al., 1993; Hendrick und Brooks, 1994; Romanelli et al., 2008). Während zunächst vermutet wurde, es handele sich um eine besondere Tumorart, die nur bei der Katze auftritt, existieren inzwischen auch Berichte über solche Tumoren bei Frettchen (Munday et al., 2003), Hunden (Vascellari et al., 2003) und Kaninchen (Petterino et al., 2009); dabei handelt es sich jedoch nur um geringe Fallzahlen von 7 Frettchen, 6 Hunden und einem Kaninchen, so dass es sich doch um einen Tumor handelt, von dem die Spezies Katze in besonderer Weise betroffen ist.

Obwohl diese Tumoren seit ihrer Erstbeschreibung Anfang der neunziger Jahre in den USA Gegenstand intensiver Forschung sind, ist über ihre Entstehungsweise noch nichts Genaues bekannt. Damals wurde vermutet, Komponenten der Impfstoffe wären für die Entstehung von VAS verantwortlich (Kass et al., 1993). Nachdem solche Tumoren zusätzlich an Orten der Injektion anderer Mittel (Gagnon, 2000) und auch im Bereich von nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Buracco et al., 2002) gefunden wurden und sie außerdem eine morphologische Ähnlichkeit mit intraokulären posttraumatischen Sarkomen besitzen, gilt ein Zusammenhang mit Entzündungen unterschiedlicher Ursachen als wahrscheinlich (Kidney, 2008; McNiel, 2001). Da für VAS eine geringe Prävalenz von 1-3,6 pro 10.000 Impfungen ermittelt wurde (Coyne et al., 1997; Kass et al., 1993), wird noch die Beteiligung einer genetischen Komponente vermutet, die einige Katzen besonders empfänglich für VAS macht (Hendrick, 1998b). Auch eine altersbedingte Immundefizienz wird mitverantwortlich gemacht (Kirpensteijn, 2006).

Es erkrankten zwar nur wenige Katzen, jedoch handelt es sich wegen des Zusammenhangs mit Impfstellen und der hohen Rezidivneigung der VAS, die eine erfolgreiche Therapie erschwert (Hershey et al., 2000), um eine Erkrankung, die auch vielen Katzenbesitzern bekannt ist und

diese beunruhigt. Dies zeigen die zahlreichen Diskussionen in verschiedenen Internetforen, z.B. <http://www.schmusekatzen.de/impfen.htm>;

<http://www.katzen-links.de/katzenforum2/archive/index.php/t-34810.html>;

<http://forum.tier-guide.com/thread.php?postid=3567>;

<http://www.wetterau-katzen.de/phpbb/viewtopic.php?p=42811>;

<http://www.catplus.de/katzenkrankheiten/das-fibrosarkom-krebs-bei-katzen>.

Solange die Entstehungsweise nicht geklärt ist und theoretisch bei jeder Impfung die Möglichkeit eines VAS gegeben ist, besteht die Gefahr der Impfmüdigkeit der Katzenbesitzer. Damit kommt der Erforschung des VAS nicht nur eine medizinisch-wissenschaftliche sondern auch eine epidemiologische und wirtschaftliche Bedeutung zu.

Ziel dieser Arbeit war es, die Transkription verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, die bei Entzündungen eine Rolle spielen, in vivo in VAS nachzuweisen und sowohl mit der Transkription in unveränderter Unterhaut als auch mit der Transkription in vitro in aus VAS gewonnenen Zelllinien zu vergleichen, um einen Hinweis auf ihre mögliche Bedeutung für VAS zu erhalten. Für die in vitro-Untersuchungen mussten zunächst entsprechende Zelllinien etabliert und charakterisiert werden.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Vakzinationsstellen-assoziiertes Sarkom (VAS) als Sonderfall des Fibrosarkoms bei der Katze**

Fibrosarkome stellen invasiv wachsende, metastasierungsfähige Fibroblastenwucherungen dar und sind bei der Katze die häufigsten mesenchymalen Hauttumoren. Sie wachsen infiltrativ und rezidivieren häufig und schnell (Kamenica et al., 2008); je nach Operationstechnik beträgt die Rezidivrate bis zu 70 % innerhalb von 4 Monaten post operationem (Hirschberger und Kessler, 2001; McNiel, 2001). Feline Fibrosarkome werden in verschiedene Gruppen eingeteilt: FeSV-induzierte Fibrosarkome, VAS, intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome und Fibrosarkome anderer Ätiologie (Hirschberger und Kessler, 2001).

Als VAS gelten solche, die sich an den für Injektionen typischen Stellen (Unterhaut im dorsalen Halsbereich, zwischen den Schulterblättern, an der seitlichen Thoraxwand, im Oberschenkelbereich) befinden. Bei ihnen handelt es sich um die am häufigsten vorkommenden Fibrosarkome der Katze. Neben Fibrosarkomen treten aber auch andere Sarkome wie Osteosarkome, Chondrosarkome, Hämangiosarkome, Myxosarkome oder Rhabdomyosarkome an Impfstellen auf (Doddy et al., 1996; Esplin et al., 1993; Hendrick und Brooks, 1994).

Zu den FeLV/FeSV-induzierten Fibrosarkomen gehören unabhängig von ihrer Lokalisation am Tierkörper solche Fibrosarkome, die durch das Feline Sarkomvirus (FeSV) verursacht werden. Dieses entsteht durch Aufnahme zellulärer Onkogene bei gleichzeitigem Verlust eigener Genomsequenzen aus dem Feline Leukämievirus (FeLV). FeSV ist daher replikationsdefekt und benötigt FeLV als Helfervirus (Rezanka et al., 1992). Da es sich bei der Bildung von FeSV aus FeLV und dessen Vermehrung mit Hilfe des FeLV um zufällige, seltene Ereignisse handelt, sind spontane, FeSV-induzierte Fibrosarkome selten; ihr Anteil an feline Fibrosarkomen beträgt ungefähr 2 % (Nagel, 1998). Intraokuläre posttraumatische Sarkome werden gelegentlich nach schwerwiegenden Augenverletzungen beobachtet. Diese entstehen durch längere Einwirkung einer chronischen Entzündung nach Ruptur der Linsenkapsel und Abbau von Linsenprotein durch Phagozytose (Dubielzig et al., 1990).

Fibrosarkome anderer Ätiologie sind solche, die sich keiner der vorgenannten Gruppen zuordnen lassen (Hirschberger und Kessler, 2001).

## 2.2 Epidemiologie

Zuerst wurde ein Zusammenhang zwischen Impfungen und VAS 1991 in den USA von Hendrick und Goldschmidt vermutet: Sie stellten nach der Einführung einer Pflicht zur Tollwutimpfung bei Katzen im Bundesstaat Pennsylvania sowie dem weitgehenden Ersatz der vorher verwendeten Lebendvakzine durch mit Adjuvantien versetzte Totvakzine einen Anstieg der Prävalenz von feline Fibrosarkomen um 61 % fest (Hendrick und Goldschmidt, 1991). Gleichzeitig kam es auch zu einer Zunahme entzündlicher Impfreaktionen (Hendrick und Dunagan, 1991). In den VAS ließ sich weder mittels Immunhistologie FeLV-Antigen noch mittels PCR exogenes FeLV-Genom nachweisen (Ellis et al., 1996); so konnte eine floride oder latente FeLV-Infektion bei den betroffenen Tieren ausgeschlossen werden. Auch eine Infektion mit feline Immundefizienzvirus, Polyomavirus, Papillomvirus und Spumavirus konnte mittels PCR nicht nachgewiesen werden (Kidney et al., 2000, 2001a; Kidney et al., 2001b; Kidney et al., 2002; Kidney et al., 2001c).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Impfung und Tumorentstehung lag damit nahe. In einer epidemiologischen Studie konnten sowohl FeLV- als auch Tollwutimpfungen mit VAS in Verbindung gebracht werden. Ein erhöhtes Risiko wurde bei Kombinationsimpfstoffen und bei mehrfacher Impfung an dieselbe Stelle gefunden (Kass et al., 1993).

In einer neuen Studie (Shaw et al., 2009), die den Zeitraum von 1990 bis 2006 umfasste, wurde der Einfluss der 1997 veröffentlichten Impfempfehlungen der Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VASTF) (Richards, 1997), untersucht. Nach diesen Empfehlungen soll nicht mehr zwischen die Schulterblätter geimpft werden, sondern Impfstoff mit Tollwutantigen soll distal an die rechte Hintergliedmaße, Impfstoff mit FeLV- aber ohne Tollwut-Antigen distal an die linke Hintergliedmaße und andere Impfstoffe sollen an die rechte Schulter appliziert werden. Es konnte für den Zeitraum ab 1997 eine statistisch signifikante Abnahme von VAS zwischen den Schulterblättern und lateral am Thorax gefunden werden. Statistisch signifikant zu nahmen dagegen VAS an den Hintergliedmaßen. Die Autoren sahen darin einen Beleg für den Zusammenhang zwischen der Entstehung von VAS und Impfungen und vermuteten, dass sich viele Tierärzte an die Impfempfehlungen der VASTF gehalten haben. Unter der Annahme, dass die Impfempfehlungen eingehalten worden waren und dass die Zahl der VAS, die durch sonstige Injektionen verursacht worden sind, zu vernachlässigen ist, wurde anhand der Lokalisation der VAS Folgendes ermittelt: Impfstoff mit Tollwut-Antigen war zu 51,7 %, Impfstoff mit FeLV-Antigen war zu 28,6 % und sonstige Impfstoffe waren zu 19,7 % für die ab 1997 gefundenen VAS verantwortlich (Richards, 1997; Shaw et al., 2009).

Die Häufigkeit der Bildung von VAS wird mit 1-2/10.000 Impfungen (Kass et al., 1993) oder mit 3,6/10.000 Impfungen (Coyne et al., 1997) angegeben. Eine neuere Studie (Gobar und Kass, 2002), in der nur unstrittig gesicherte VAS berücksichtigt wurden, kommt auf eine sehr niedrige Prävalenz von 0,63 VAS/10.000 Katzen oder 0,32 VAS/10.000 Impfungen. Dieser niedrige Wert ist eventuell auch dadurch zu erklären, dass von 35 ursprünglich gemeldeten VAS nur 2 als unstrittig gesichert in die Berechnung eingingen. Die anderen 33 wurden aus folgenden Gründen nicht berücksichtigt: Über eine Impfung an der entsprechenden Stelle war nichts bekannt, die letzte Impfung hatte vor dem Beobachtungszeitraum von 2 Jahren stattgefunden oder war von einem anderen Tierarzt als dem Studienteilnehmer vorgenommen worden. In einigen Fällen wurden vom behandelnden Tierarzt nicht alle nötigen Informationen zur Verfügung gestellt.

Die oben genannten Studien wurden alle in den USA durchgeführt. In Europa existiert eine Studie aus dem Vereinigten Königreich: Danach stieg die Anzahl der gemeldeten VAS von 2 im Jahr 1996 auf 24 im Jahr 2000. Unklar war, ob eine zunehmende Prävalenz oder aber eine häufigere Meldung oder ein besseres Erkennen von VAS die Ursache für diesen Anstieg war. Die Prävalenz für den Zeitraum von 1996 bis 1999 betrug 0,021/10.000 Impfungen. Es wurde eine erhöhte Prävalenz für FeLV-Impfungen festgestellt, diese war jedoch nicht statistisch signifikant (Gaskell R. M., 2002).

Die Zeitspanne von der Impfung bis zur Tumorentstehung schwankte zwischen drei Monaten und drei Jahren (Doddy et al., 1996). Teilweise wurde auch ein größerer Zeitraum von 4 Wochen bis zu 10 Jahren angegeben (Shaw et al., 2009). Ein Zusammenhang mit Geschlecht, Rasse oder Kastrationsstatus war nicht festzustellen (Doddy et al., 1996). In einer Studie, in der Laborwerte von Katzen mit VAS mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wurden, konnten keine für VAS typischen Veränderungen von Blutbild oder Serumparametern nachgewiesen werden (Haas, 2008). Es zeigte sich aber, dass die Katzen mit VAS im Median ein statistisch signifikant höheres Körpergewicht hatten als die Katzen der Kontrollgruppe, so dass möglicherweise ein höheres Risiko für die Entstehung eines VAS bei adipösen Katzen gegeben ist (Haas, 2008).

Das Durchschnittsalter der Katzen mit VAS betrug 8 Jahre, das der Katzen mit (Fibro-) Sarkomen anderer Ätiologie, d.h. nicht FeLV/FeSV-assoziierten und nicht an Impfstellen gelegenen Fibrosarkomen, 11 Jahre (Hirschberger und Kessler, 2001). Zu einem etwas höheren Alter von ca. 10 Jahren der Tiere mit VAS kamen Bleier (2003), Couto et al. (2002), Romanelli et al. (2008) und Haas (2008). Kass et al. (1993) stellten dagegen eine bimodale Altersverteilung mit Häufungen bei sechs- bis sieben- und zehn- bis elfjährigen Katzen fest.

## 2.3 Morphologie

Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass neben den am häufigsten auftretenden Fibrosarkomen auch Myxosarkome, Osteosarkome, Chondrosarkome, maligne fibröse Histiozytome, Rhabdomyosarkome oder Liposarkome entstehen können (Chang et al., 2006; Esplin et al., 1993; Hendrick und Brooks, 1994; Romanelli et al., 2008).

Doddy et al. stellten 1996 statistisch signifikante Differenzen zwischen VAS und solchen anderer Ätiologie fest: VAS lagen häufiger in der Subkutis als in der Dermis. Sie wiesen im Gegensatz zu den anderen Typen häufiger Nekrose, Entzündung, Granulationsgewebe, Zellpleomorphismus, lokal invasives Wachstum sowie eine Variabilität von Dichte und Qualität der extrazellulären Matrix auf. Hinsichtlich der Zahl von mehrkernigen Riesenzellen bestand kein signifikanter Unterschied (Doddy et al., 1996).

Auch Alberdein et al. (2007) stellten fest, dass VAS häufiger in der Unterhaut lagen, größeren Zellpleomorphismus zeigten, höhere Mitoseraten sowie häufiger Lymphozytenaggregate in der Peripherie aufwiesen.

Zu teilweise anderen Ergebnissen kam Bleier (2003) im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Untersuchungen an 364 Fibrosarkomen: Die Tumorzellmorphologie war weitgehend vergleichbar, allerdings fanden sich Riesenzellen überwiegend in VAS. Alle Arten von Fibrosarkomen wiesen – vor allem in der Peripherie – entzündliche Infiltrate auf. Diese waren ausgeprägter bei den VAS. Die Mehrzahl der Entzündungszellen waren bei FeLV-positiven Fibrosarkomen T-Zellen, bei den FeLV-negativen dagegen B-Zellen, jeweils nodulär und vorwiegend in der Peripherie angeordnet.

Couto et al. (2002) teilten VAS nach Zelldifferenzierung, Nekrose und Mitoserate nach einem aus der Humanmedizin (Coindre et al., 1988) übernommenen und bereits auf Sarkome des Hundes (Powers et al., 1995) übertragenen Schema in Grade ein. In ihrer Untersuchung an 44 VAS stellten sie eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Riesenzellen und dem Differenzierungsgrad fest. Danach kamen Riesenzellen vor allem in schlecht differenzierten VAS vor. Kein statistisch relevanter Zusammenhang konnte dagegen zwischen dem Differenzierungsgrad und dem Vorhandensein bzw. der Intensität entzündlicher Infiltrate nachgewiesen werden. Sie fanden in den peripheren entzündlichen Infiltraten im Gegensatz zu Bleier (2003) einen hohen Gehalt an T-Zellen von durchschnittlich 47 % (Couto et al., 2002), wobei sie jedoch für den B-Zell-Nachweis einen anderen Antikörper als Bleier verwendeten.



Die meisten VAS wiesen neben Fibroblasten auch Myofibroblasten auf (Hendrick und Brooks, 1994; Madewell et al., 2001). Dabei handelt es sich um Zellen, die morphologisch Fibroblasten ähneln und Kollagen produzieren, jedoch zur Kontraktion befähigt sind. Sie entstehen unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus noch nicht genau bekannten Zellen (Couto et al., 2002). Diskutiert wird eine Entstehung aus Stammzellen (Bockman und Sohal, 1998), aus Zellen des Neuralrohrs (Jain et al., 1998), eine Transdifferenzierung aus Fibroblasten (Gabbiani, 1996; Hinz et al., 2007) oder Glattmuskelzellen (Ronnov-Jessen et al., 1995) des Gewebes.

## **2.4 Pathogenese**

### **2.4.1 VAS und Entzündung**

Der genaue Zusammenhang zwischen Impfung und Tumorentstehung ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass eine entzündliche Reaktion nach der Impfung auftritt und in seltenen Fällen zu einer Entartung der beteiligten Fibroblasten im Granulationsgewebe führt. Dafür sprechen die bei VAS signifikant häufiger beziehungsweise stärker als bei anderen Fibrosarkomen ausgeprägten Entzündungsreaktionen und Nekrosen. Außerdem ist von den sich histologisch ähnlich darstellenden okulären Fibrosarkomen bekannt, dass sie häufig mit einer Uveitis oder einem Augentrauma in Verbindung gebracht werden können. Als Entstehungsmechanismus wird die längere Einwirkung einer chronischen Entzündung nach Ruptur der Linsenkapsel und Abbau von Linsenprotein durch Phagozytose angesehen (Dubielzig et al., 1990; Macy und Hendrick, 1996; Zeiss et al., 2003).

Da sowohl in Makrophagen aus der Umgebung einiger Tumoren (Hendrick et al., 1992) als auch in Tumorzellen selbst (Madewell et al., 2001) und in zentraler Nekrose sowie mehrkernigen Riesenzellen (Deim et al., 2008) eine Aluminiumverbindung nachgewiesen werden konnte, wurden zunächst nur aluminiumhaltige Adjuvantien als Tumorinduktoren angesehen. Danach kamen aluminiumfreie Impfstoffe ebenfalls in den Verdacht, Tumorbildung zu induzieren (Kass et al., 1993). De Man und Ducatelle (2007) beobachteten das Auftreten zweier bilateraler VAS bei einem 8 Jahre alten, kastrierten Kater nach Impfung mit Herpes-, Parvo- und Calicivirusimpfstoff.

Inzwischen werden aber auch andere Auslöser als Impfungen mit VAS in Zusammenhang gebracht:

Gagnon (2000) berichtete über die Entstehung eines Fibrosarkoms eines 13 Jahre alten, kastrierten Katers 2 Monate nach Verabreichung einer Kombination von Depotpenicillin,

Metoclopramid und Dexamethason zwischen die Schulterblätter. Das betroffene Tier war nachweislich mindestens die letzten 6 Jahre zuvor nicht geimpft worden.

Buracco et al. (2002) beschrieben ein Fibrosarkom an der ventralen Bauchwand einer Katze, die vor 7 Jahren kastriert worden war. Über ein weiteres Trauma an dieser Stelle war nichts bekannt. Im Zytoplasma von Makrophagen sowie zwischen den Tumorzellen konnten Reste von nicht resorbierbarem Nahtmaterial nachgewiesen werden (Buracco et al., 2002).

Diese Berichte zeigen, dass es vermutlich besonders auf eine Entzündungsreaktion als Ausgang der Fibrosarkomentstehung ankommt. Dabei scheint es unerheblich zu sein, ob die Entzündung durch subkutanes Beibringen eines Fremdkörpers wie Adjuvantien, verbliebenes, nicht resorbierbares Nahtmaterial oder durch Inkompatibilität zwischen in Kombination verabreichten Medikamenten verursacht wird (Buracco et al., 2002).

Es wurde auch über einen Mikrochip im Zusammenhang mit dem Fund eines Fibrosarkoms bei einer Katze berichtet (Daly et al., 2008). In diesem Fall befand sich das Fibrosarkom jedoch an einer Impfstelle, die Katze war auch mehrfach an dieser Stelle geimpft worden und der Mikrochip lag nicht im Zentrum, sondern am kranialen Rand des Tumors. In diesem Fall konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein durch die Impfungen verursachtes VAS handelte und die Nähe zum Mikrochip nur zufällig war.

#### **2.4.1.1 Zusammenhänge zwischen chronischer Entzündung und Tumorentstehung**

Die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen Entzündung und Tumorentstehung ist nicht neu: Schon 1863 schloss Rudolf Virchow aus dem Auftreten von Leukozyten in neoplastischen Geweben, dass Tumoren an Orten chronischer Entzündung entstehen. Heute werden ca. 15 % aller Neoplasien beim Menschen weltweit infektiösen Agentien zugeschrieben, wobei der durch diese ausgelösten chronischen Entzündung eine wichtige Rolle zukommt (Balkwill und Mantovani, 2001). Beispiele sind Blasenkrebs nach Schistosomiasis, Magenkrebs bei Infektion mit *Helicobacter pylori*, Hepatozelluläres Karzinom bei einer Infektion mit Hepatitis B und/oder C Virus oder Kaposi Sarkom bei Infektion mit Humanem Herpesvirus 8 (Coussens und Werb, 2002).

In einer Studie mit Hühnern wurden gerade geschlüpfte Küken mit Rous Sarkomvirus infiziert. Diese entwickelten an der Inokulationsstelle einen Primärtumor, innerhalb der nächsten vier bis acht Wochen traten aber keine weiteren Tumoren an anderen Körperstellen auf. Wurde jedoch den Hühnern eine Wunde fern der Inokulationsstelle zugefügt, so entwickelte sich auch dort ein Tumor. Dabei handelte es sich nicht um eine Metastase des

Primärtumors, sondern es wurde vermutet, dass Entzündungsfaktoren, die im Zusammenhang mit der Wunde freigesetzt waren, zu der Tumorentstehung beigetragen haben (Martins Green et al., 1994; Sieweke et al., 1990).

Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Neoplasie wird auch angenommen bei einer chronischen Entzündung nichtinfektiöser Ursache, z.B. die Entstehung eines Malignen Melanoms nach starker UV-Strahlung, eines Kolorektalen Karzinoms bei „Inflammatory Bowel Disease“, eines Ösophaguskarzinoms bei Refluxösophagitis, eines Mesothelioms oder Bronchialkarzinoms nach Asbestexposition oder eines Bronchialkarzinoms durch Zigarettenrauch (Balkwill und Mantovani, 2001). Entscheidend scheint die Dauer der Entzündung zu sein: Während eine akute Entzündung, die nur kurz dauert, meist einen therapeutischen Effekt hat, kann sich eine chronische Entzündung negativ auf den Organismus auswirken und unter anderem eine Tumorentstehung begünstigen. Chronische Entzündungen konnten mit zahlreichen Schritten, die bei der Tumorentstehung beteiligt sind, in Verbindung gebracht werden, wie z.B. mit zellulärer Transformation, Promotion, Proliferation, Invasion, Angiogenese und Metastasierung (Aggarwal et al., 2006).

#### **2.4.1.2 Wachstumsfaktoren und Zytokine**

Maligne Zellen zeichnen sich durch mehrere Eigenschaften aus, die sie von nicht malignen Zellen unterscheiden. Eine dieser Eigenschaften besteht darin, autark in Bezug auf proliferationsfördernde Faktoren zu sein; während nicht maligne Zellen nur proliferieren können, wenn sie entsprechende Signale dazu erhalten, trifft dies auf maligne Zellen nicht im gleichen Maß zu. Es wird vermutet, dass diese Eigenschaft alle Tumorzellen auszeichnet (Hanahan und Weinberg, 2000). Zum Erreichen dieser Unabhängigkeit gibt es mehrere Möglichkeiten: So können viele Tumorzellen die benötigten Wachstumsfaktoren und Zytokine selbst produzieren und das eigene Wachstum autokrin stimulieren. Nachgewiesen ist z.B. die Produktion von „platelet derived growth factor“ (PDGF) durch Glioblastome und Sarkome (Hanahan und Weinberg, 2000), „transforming growth factor“ (TGF) $\beta$  in Gallenblasentumoren (Kitamura et al., 2003) und Chondrosarkomen (Masi et al., 2002) und „tumor necrosis factor“ (TNF) in einem humanen ovariellen Fibrosarkom (Fukuda et al., 2001). Weiterhin findet auch häufig eine Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren statt, was zu einer Hyperreaktivität führt, d.h. die Zelle reagiert schon auf normale Level an Wachstumsfaktoren mit Proliferation. Teilweise werden auch Rezeptoren exprimiert, die, sogar ohne einen Liganden zu binden, Signale transduzieren (Hanahan und Weinberg, 2000). In diesem Zusammenhang spielen auch Onkogene eine Rolle: Eine Vielzahl von Onkogenen

ist bekannt, deren Wirkung gerade auf der Überexpression eines Wachstumsfaktors oder dessen Rezeptors beruht, so zum Beispiel v-sis, das für einen Typ von PDGF kodiert (Doolittle et al., 1983; Waterfield et al., 1983), oder v-erb, das für einen „epidermal growth factor“ (EGF)-Rezeptor kodiert (Danielsen und Maihle, 2002). Außerdem können Wachstumsfaktoren und Zytokine als Bestandteil des entzündlichen Milieus eine Bedeutung bei der Tumorentstehung im Zusammenhang mit einer Entzündung haben (Lu et al., 2006).

Während sich früher die Forschung hauptsächlich auf die Tumorzellen selbst mit ihren genetischen Veränderungen konzentriert hat, wird inzwischen auch der Tumorumgebung eine große Bedeutung beigemessen. Es wird angenommen, dass scheinbar normale Zellen der Umgebung wie Fibroblasten und Gefäßendothelzellen einen Beitrag zum Tumorwachstum leisten, dessen genaue Bedeutung noch unbekannt ist (Hanahan und Weinberg, 2000). Auch Entzündungszellen, die häufig in Tumoren oder deren Umgebung beobachtet werden, können wachstumsfördernd einwirken. Inwieweit diese Entzündungszellen den Tumor bekämpfen oder seine Entwicklung fördern, ist noch nicht genau geklärt; es scheinen jedoch die fördernden Wirkungen zu überwiegen (Cordon Cardo und Prives, 1999; Coussens et al., 1999; Hudson et al., 1999). Dies zeigt sich auch daran, dass in vielen humanmedizinischen Studien ein statistisch signifikanter, negativer Zusammenhang zwischen dem Grad der entzündlichen Infiltration und der Überlebenszeit der Patienten hergestellt werden konnte: Je ausgeprägter die Entzündung war, desto kürzer war die mittlere Überlebenszeit (Lewis und Pollard, 2006; Mantovani et al., 2006; Sica et al., 2002a). Bei den Entzündungszellen, die häufig in Tumoren oder deren Umgebung gefunden werden, handelt es sich vor allem um Makrophagen, auch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) genannt (Ben Baruch, 2006; Mantovani et al., 2004; Porta et al., 2007). Diese werden als wichtigste Schaltstellen bei der Verbindung zwischen Entzündung und Tumor angesehen (Allavena et al., 2008). Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Enzymen sind sie an der Regelung von Tumorwachstum, Angiogenese, Invasion und Metastasierung beteiligt (Lewis und Pollard, 2006).

Gerade bei VAS, deren Entstehung mit einer Entzündungsreaktion zusammenzuhängen scheint und in denen regelmäßig Entzündungszellen gefunden werden (Couto et al., 2002; Hendrick, 1998b; Kidney, 2008), ist es sinnvoll, die Transkription solcher Wachstumsfaktoren und Zytokine zu untersuchen, die bei Entzündungen eine Rolle spielen.

Wachstumsfaktoren und Zytokine, die im Zusammenhang mit Entzündungen stehen und damit möglicherweise Tumorentstehung und -wachstum fördern, sind unter anderem „epidermal growth factor“ (EGF), „transforming growth factor“ (TGF)- $\alpha$  und - $\beta$ , „platelet

derived growth factor“ (PDGF) und „fibroblast growth factors“ (FGFs), Interleukin-1 (IL-1) und „tumor necrosis factor“ (TNF).

#### **2.4.1.2.1 TNF**

TNF wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten produziert, obwohl auch andere Zellarten wie z.B. Fibroblasten, Glattmuskelzellen oder Tumorzellen TNF exprimieren können (Mocellin et al., 2005). Auch Myofibroblasten produzieren TNF (Powell et al., 1999). Bei Entzündungen wirkt TNF entzündungsfördernd, vor allem durch seine Wirkung auf Blutgefäße mit Endothelzellaktivierung, Hochregulierung von Oberflächenrezeptoren und Verlust der Zell-zu-Zell-Adhäsion, um die Beseitigung der Noxe zu fördern. Eine Überexpression von TNF unterhält typische Entzündungszeichen wie Undichtwerden von Kapillaren, Stauung, Anheftung und Diapedese von Leukozyten und Gewebsschädigung durch die infiltrierenden Leukozyten (Mocellin et al., 2005). TNF ist in der Lage, programmierten Zelltod auszulösen und damit geschädigte Zellen an Orten chronischer Entzündung zu eliminieren (Balkwill, 2002). Besonders bedeutend in Bezug auf VAS, die sich histologisch meist als Fibrosarkome darstellen, könnte die Wirkung von TNF auf Fibroblasten sein: Bei murinen und humanen Fibroblasten wurde nachgewiesen, dass er sowohl die Kollagenproduktion induzieren (Gordon et al., 1992; Mauviel et al., 1991) als auch ihr Wachstum stimulieren kann (Battegay et al., 1995). Im Zusammenhang mit Tumoren besitzt TNF paradoxe Wirkungen. Einerseits besitzt TNF eine starke Antitumorwirkung, indem es selektiv die Gefäße in Tumoren zerstört (Lejeune et al., 1998). Diese Wirkung wurde ausgiebig am murinen Methylcholanthren (Meth-A)-induzierten Fibrosarkommodell untersucht: Meth-A Tumorzellen in vitro sind resistent gegen den zytotoxischen Effekt von TNF, aber in vivo führt eine systemische Administration von TNF zu hämorrhagischer Nekrose in gefäßreichen subkutanen, nicht aber in weitgehend avaskulären peritonealen Tumoren (Palladino et al., 1987; Van de Wiel et al., 1989). Damit könnte TNF für die häufig gefundenen Nekrosen in VAS mitverantwortlich sein. Auch wurde festgestellt, dass TNF-Knockoutmäuse stärker empfänglich für Meth-A-induzierte Fibrosarkome sind als Wildtyp-Mäuse; zumindest in diesem Modell schützt TNF den Wirt vor Tumorentstehung (Swann et al., 2008).

Andererseits weisen zahlreiche Experimente auch auf eine tumorfördernde Wirkung von TNF hin. So sind TNF-Knockoutmäuse gegen die Entwicklung von Hauttumoren nach Initiation mit Dimethylbenzanthrazen (DMBA) und Promotion mit Tetradeconoylphorbol-13-azetat (TPA) oder DMBA resistent (Moore et al., 1999). TNF-Behandlung von Mäusen mit

xenogenen Ovarialtumoren fördert die peritoneale Anhaftung und Ausbildung solider Tumoren (Malik et al., 1989) und Überexpression von TNF durch Tumorzellen fördert invasive Eigenschaften von einigen syngenischen und xenogenen Tumoren (Malik et al., 1990). Eine einzige, intraperitoneale Applikation von TNF vor der intravenösen Gabe von Fibrosarkomzellen an Mäuse vergrößerte die Zahl der Lungenmetastasen; eine in vivo-Neutralisation von endogenem TNF verringerte dagegen die Zahl der Lungenmetastasen (Orosz et al., 1993). Neben der oben beschriebenen, wachstumsfördernden Wirkung auf Fibroblasten wirkt TNF transformierend auf mit einem Karzinogen behandelte Fibroblasten (Balkwill, 2002). Der genaue Mechanismus ist unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) dabei eine Rolle spielt (Balkwill, 2002).

Welche Wirkung von TNF vorherrscht, hängt vermutlich von der Menge ab. So soll eine einmalige, größere, extern verabreichte Menge eher eine Antitumorstoffwirkung haben, während eine fortwährende Produktion geringerer Menge von Tumorzellen oder anderen Zellen in Tumoren, wie sie auch in VAS stattfinden könnte, das Tumorstoffwachstum eher fördern soll (Lu et al., 2006).

#### **2.4.1.2.2 IL-1 $\beta$**

Eng im Zusammenhang mit TNF steht IL-1 $\beta$ . Die Expression dieses Zytokins wird durch TNF induziert und verstärkt die Wirkung von TNF (Elaraj et al., 2006). Auch wird vermutet, dass IL-1 $\beta$  die Expression von TNF fördert (Nazarenko et al., 2008). Daher ist anzunehmen, dass im Fall einer erhöhten Transkription von TNF in VAS auch die Transkription von IL-1 $\beta$  erhöht ist.

Hauptproduzenten für IL-1 $\beta$  sind aktivierte Makrophagen, aber auch andere Zellen wie Epithelzellen, Lymphozyten und glatte Muskelzellen sind in der Lage, IL-1 $\beta$  zu produzieren (Dinarello, 1988; Fonfara, 2002; Libby et al., 1986). Eine Produktion von IL-1 $\beta$  findet ebenfalls durch Myofibroblasten statt (Pang et al., 1994; Powell et al., 1999; Tetsuka et al., 1996; Valentich et al., 1997).

Die Produktion von IL-1 $\beta$  wurde in vielen humanen und murinen Tumoren nachgewiesen, sie fördert Wachstum und Metastasierung und konnte mit einem besonders aggressiven Wachstumsverhalten in Verbindung gebracht werden (Apte et al., 2006; Elaraj et al., 2006). Bei in vivo-Versuchen mit murinen, IL-1 $\beta$ -kompetenten, Meth-A-induzierten Fibrosarkomzelllinien zeigten diese sowohl in immunkompetenten als auch in nicht immunkompetenten Mäusen ein besonders aggressives und infiltratives Wachstum (Marhaba et al., 2008; Nazarenko et al., 2008). Der Mechanismus dafür ist noch unklar: Bei in vitro-

Versuchen mit diesen Zelllinien konnte eine höhere Proliferationsaktivität im Vergleich zu nicht IL-1 $\beta$ -kompetenten Zelllinien nicht nachgewiesen werden; vermutet wird eine Erhöhung der Resistenz gegen Apoptose (Nazarenko et al., 2008).

Im Zusammenhang mit chemischer Kanzerogenese wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  aus der Mikroumgebung als Promotor wirkt (Krelin et al., 2007).

IL-1 $\beta$  fördert zusammen mit TNF und Interferon (IFN) die Bildung von ROS. Wie auch TNF ist IL-1 $\beta$  in der Lage, die Produktion von angiogenetischen Faktoren zu fördern (Balkwill, 2002), und könnte so zum Wachstum von VAS beitragen. Weiterhin fördert es zusammen mit TNF die Bildung von Adhäsionsmolekülen (Dinarello, 2006) und Metalloproteinase-9, die eine Auflösung von Kollagen bewirkt (Nicola et al., 1997), und fördert so möglicherweise das invasive Wachstum von VAS.

#### **2.4.1.2.3 PDGF**

PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der in Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung freigesetzt wird, aber auch von einer Vielzahl weiterer Zellen wie Endothelzellen oder Tumorzellen produziert werden kann (Nicola et al., 1997). Auch Myofibroblasten produzieren PDGF (Leveen et al., 1994; Lindahl et al., 1997). Er wirkt mitogen und chemoattraktiv auf Fibroblasten und Myofibroblasten (Ostman, 2004). Neben „connective tissue growth factor“ (CTGF), einem weiteren Mitglied der PDGF-Familie, ist PDGF der wichtigste Faktor für die Proliferation von Myofibroblasten (Friedman, 1997; Grotendorst, 1997; Jobson et al., 1998; Mallat et al., 1998). Außerdem wird vermutet, dass PDGF eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum spielt (Abdiu et al., 1999). Durch Injektion eines Retrovirus, das transgen die humane PDGF-B-Kette kodiert, konnte bei neugeborenen Mäusen an der Inokulationsstelle die Entstehung von Fibrosarkomen ausgelöst werden (Pech et al., 1989). In der oben bereits erwähnten Studie von Martins-Green et al. (1994) zur Tumorentstehung bei Rous Sarkomvirus-infizierten Hühnerküken stellte sich heraus, dass in 25 % der Fälle die Injektion von PDGF das Zufügen einer Wunde als Promotor für die Tumorentstehung ersetzte. In vielen mesenchymalen Tumoren des Menschen wurden PDGF und/oder PDGF-Rezeptoren nachgewiesen (Ostman, 2004; Smits et al., 1992; Wang et al., 1994). Auch von einigen aus Tumoren gewonnenen Zelllinien ist bekannt, dass sie PDGF produzieren und in den Überstand sezernieren (Abdiu et al., 1998; Bell et al., 1989). Daher könnte PDGF auch im Zusammenhang mit VAS eine Rolle spielen. Zusätzlich sind auch proangiogene Wirkungen bekannt und die Ergebnisse zahlreicher Studien sprechen dafür, dass PDGF die Angiogenese

in Tumoren fördert (Abramsson et al., 2003; Erber et al., 2004; Furuhashi et al., 2004; Guo et al., 2003).

#### **2.4.1.2.4 TGFβ1**

TGFβ kommt bei Säugetieren als TGFβ1, TGFβ2 und TGFβ3 vor, die von verschiedenen Genen kodiert werden und dieselben Rezeptorsignalsysteme benutzen (Derynck et al., 2001). Von diesen ist TGFβ1 am häufigsten in humanen Tumorzellen hochreguliert (Derynck et al., 1987) und Gegenstand der meisten Studien zur Rolle von TGFβ bei der Tumorgenese. Untersuchungen an humanen Tumoren haben gezeigt, dass TGFβ1 sowohl tumorsuppressive als auch tumorfördernde Eigenschaften besitzt (Akhurst und Derynck, 2001; Levy und Hill, 2006). Die tumorsuppressive Wirkung von TGFβ1 wurde vor allem für Frühstadien epithelialer Tumoren beschrieben und besteht besonders darin, dass die Proliferation von epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen gehemmt wird (Elliott und Blobel, 2005). Aber auch bei einigen Arten von mesenchymalen Zellen wird die Proliferation durch TGFβ1 gehemmt (Massague et al., 2000). Eine weitere tumorsuppressive Wirkung von TGFβ1 besteht, darin, dass die Hochregulierung von Telomerase verhindert wird. Diese findet in ca. 90 % aller humanen Tumoren statt und dient dem Erhalt der Chromosomenenden bei einer Vielzahl von Zellteilungen und damit der Immortalisierung der Zellen (Elliott und Blobel, 2005). Außerdem kann TGFβ1 die Apoptose von Zellen regeln und wirkt meistens proapoptotisch (Perlman et al., 2001; Schuster und Kriegstein, 2002).

In Bezug auf das Verhalten von mesenchymalen Zellen besitzt TGFβ1 die Fähigkeit, wachstumsfördernd und transformierend zu wirken (Elliott und Blobel, 2005). So wurde er zuerst als Komponente isoliert, die in normalen Fibroblasten der Rattenniere einen transformierten Phänotyp induzieren kann (de Larco und Todaro, 1978). In der oben bereits erwähnten Studie von Martins-Green et al. (1994) zur Tumorentstehung bei Rous Sarkomvirus-infizierten Hühnerküken stellte sich heraus, dass die Injektion von TGFβ1 das Zufügen einer Wunde als Promotor für die Tumorentstehung sogar in 100 % der Fälle ersetzte. Die wachstumsfördernde Wirkung von TGFβ1 wird unter anderem durch eine Erhöhung der Produktion mitogener Wachstumsfaktoren wie PDGF (Seifert et al., 1994), FGF-2 (Strutz et al., 2001) und TGFα erzielt und wird auch in vielen epithelialen Zelllinien beobachtet (Elliott und Blobel, 2005). TGFβ1 fördert nicht nur das Wachstum, sondern auch die Invasion und Metastasierung von Tumoren. Bei epithelialen Tumoren geschieht dies durch epithelial-mesenchymale Transformation (EMT), die mit einer Verringerung von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin (Akhurst und Derynck, 2001) und einer Erhöhung der



Zellmotilität (Zicha et al., 1999) verbunden ist. Zusätzlich wird die proteolytische Aktivität der Tumorzellen durch Erhöhung der Expression von Enzymen, die die Matrix auflösen, wie Metalloproteinasen und Kollagenase, gefördert (Desruisseau et al., 1996). Diese proteasereiche Umgebung sorgt auch dafür, dass neue Gefäße für die Tumorversorgung leichter einsprossen können (Akhurst und Derynck, 2001). Direkt angiogenesefördernd wirkt TGF $\beta$ 1 durch Erhöhung der Expression von „vascular endothelial cell growth factor (VEGF)“ (Pertovaara et al., 1994; Powell et al., 1999; Yamamoto et al., 2001). Die Sekretion von TGF $\beta$ 1 ist auch ein bedeutender Mechanismus, durch den sich Tumorzellen vor der Immunantwort des Körpers schützen (Moustakas et al., 2002). Immunsuppressive Effekte von TGF $\beta$ 1 wurden sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen und werden hauptsächlich durch Effekte auf T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen vermittelt (Elliott und Blobe, 2005). TGF $\beta$ 1 blockiert die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und verhindert so die IL-2 abhängige Proliferation von T-Zellen (Kehrl et al., 1986). TGF $\beta$ 1 verhindert auch die Differenzierung von T-Zellen zu Helferzellen oder zytotoxischen Zellen (Gorelik und Flavell, 2002). Weiterhin verhindert TGF $\beta$ 1 die Expression der zytolytischen Genprodukte Perforin, Granzym A und B, Fas-Ligand und Interferon- $\gamma$  durch zytotoxische T-Zellen (Thomas und Massague, 2005).

Bei Myofibroblasten, einem häufig in VAS beobachtetem Zelltyp (Couto et al., 2002), ist TGF $\beta$ 1 der wichtigste Wachstumsfaktor, der die Synthese von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) induziert (Gressner, 1996; Hautmann et al., 1997; Powell et al., 1999; Serini und Gabbiani, 1999; Shi et al., 1996; Tamm et al., 1996). Auch wird durch TGF $\beta$ 1 die Entstehung eines aktivierten Phänotyps induziert, der zur Kollagensynthese fähig ist (Border und Noble, 1994; Muchaneta Kubara und el Nahas, 1997).

#### **2.4.1.2.5 EGF**

EGF wird in heilenden Hautwunden von Keratinozyten, Makrophagen und anderen Entzündungszellen produziert. Er wirkt mitogen auf eine Reihe von epithelialen Zellen, aber auch auf Fibroblasten und fördert die Bildung von Granulationsgewebe (Robbins und Cotran, 2005). Eine Studie an kultivierten gynäkologischen Tumorzellen verschiedener Karzinome ergab, dass EGF die Invasion und Metastasierung der Zellen fördert (Ueda et al., 1999). In desmoiden Tumoren, bei denen es sich wie bei VAS um aggressiv invasiv wachsende, mesenchymale Tumoren handelt, wurde eine verstärkte Expression von EGF in Endothelzellen der Blutgefäße der Tumoren gefunden (Mills et al., 2000). Eine Wirkung von

EGF als Promotor bei der Entstehung von Tumoren bei Rous Sarkomvirus-infizierten Hühnerküken konnten Martins-Green et al. (1994) jedoch nicht nachweisen.

#### **2.4.1.2.6 FGF-2**

FGF-2 ist eines von 22 Mitgliedern der FGF-Familie, einer Gruppe von Wachstumsfaktoren mit verschiedenen biologischen Wirkungen, wie z.B. die Wirkung als Breitspektrum-Mitogen oder die Induktion von Zellmigration oder Zelldifferenzierung (Grose und Dickson, 2005). FGF-2 fördert nicht nur die Zellteilung von Fibroblasten, sondern einer Vielzahl von Zellen mesodermalen, ektodermalen und entodermalen Ursprungs (Gospodarowicz et al., 1987). Darüber hinaus besteht eine der wichtigsten Wirkungen von FGF-2 in seiner proangiogenen Wirkung (Basilico und Moscatelli, 1992; Folkman und Klagsbrun, 1987). Diese wurde sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen (Presta et al., 2005). In vitro stimuliert FGF-2 die Proliferation (Cross und Claesson Welsh, 2001) und Chemotaxis (Stokes et al., 1990; Terranova et al., 1985) von Endothelzellen. Weiterhin bewirkt er die verstärkte Produktion von proteolytischen Enzymen durch Endothelzellen, die dadurch die Basalmembran penetrieren können (Hiraoka et al., 1998; Liotta et al., 1991; Mignatti und Rifkin, 2000; Mignatti et al., 1989). Dabei handelt es sich um einen wichtigen Schritt der frühen Angiogenese. Auch in mehreren Modellen in vivo konnte eine angiogene Wirkung von FGF-2 nachgewiesen werden (Hayek et al., 1987; Lobb et al., 1985; Shing et al., 1985; Thomas et al., 1985). Mit seiner mitogenen und angiogenen Wirkung ist FGF-2 von Bedeutung für Wundheilung und Granulationsgewebsbildung (Basilico und Moscatelli, 1992; Bikfalvi et al., 1997).

Außerdem kann FGF-2 durch seine angiogene Wirkung das Wachstum von soliden Tumoren fördern. Diese benötigen, um eine bestimmte Größe zu erreichen, das Einsprossen von neuen Gefäßen (Folkman, 1990; Sica et al., 2002b). Von vielen Tumoren ist bekannt, dass sie FGF-2 produzieren (Arbiser et al., 2000; Kanda et al., 2005). Auch in zahlreichen Tumorzelllinien wurde eine Expression/Produktion von FGF-2 nachgewiesen (Moscatelli et al., 1986; Presta et al., 1986), so auch in kultivierten Zellen eines transgenen Mausmodells zum dermalen Fibrosarkom verursacht durch bovines Papillomavirus 1 (Kandel et al., 1991).

Martins-Green et al. (1994) konnten in ihrer Studie zur Tumorentstehung bei Rous Sarkomvirus-infizierten Hühnerküken nachweisen, dass in 60 % der Fälle die Injektion von FGF-2 das Zufügen einer Wunde als Promotor für die Tumorentstehung ersetzte. Durch gleichzeitiges Verabreichen von Heparin, das den Abbau von FGF-2 verzögert, wurde dies sogar auf 80 % gesteigert (Martins Green et al., 1994).

In mehreren Studien wurde bei verschiedenen Tumorarten eine Korrelation zwischen FGF-2-mRNS oder -Protein und schlechter Prognose, nicht aber zwischen FGF-2-mRNS oder -Protein und Kapillardichte festgestellt. Dies spricht dafür, dass FGF-2 nicht nur durch seine angiogene Wirkung Tumorwachstum fördert, sondern auch direkt auf die Tumorzellen wirkt (Presta et al., 2005). Dies könnte gerade wegen der mitogenen Wirkung von FGF-2 auf Fibroblasten bei VAS der Fall sein (Nieto et al., 2003).

#### **2.4.1.3 Untersuchungen zu Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Zusammenhang mit VAS**

Bis jetzt wurden erst wenige Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und feline VAS durchgeführt.

In einer Studie (Dambach et al., 1996) wurden VAS, nicht-VAS, unveränderte Katzenhaut und Impfreaktionsstellen von Katzen vergleichend immunhistologisch auf EGF, PDGF und TGF $\beta$  untersucht. Dabei wurde in VAS durchweg eine deutliche Reaktion für EGF, PDGF und TGF $\beta$  beobachtet, während die Farbreaktion in den nicht-VAS schwach und unregelmäßig war. Lymphozyten in VAS und Impfreaktionsstellen waren positiv für PDGF, aber in Lymphozyten an Entzündungsstellen, die nicht durch eine Impfung verursacht worden waren, und in einem unveränderten Lymphknoten konnte immunhistologisch kein PDGF nachgewiesen werden.

Hendrick (1998a) wies immunhistologisch in VAS eine leichte bis starke Expression von PDGF in eingewanderten Lymphozyten sowie von PDGF-Rezeptor in nahegelegenen Tumorzellen und Makrophagen nach, wohingegen eine solche in Fibrosarkomen anderer Ätiologie nicht oder nur sehr schwach festgestellt wurde. Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass Lymphozyten in VAS PDGF produzieren, dadurch Makrophagen rekrutieren und gleichzeitig eine Fibroblastenproliferation bewirken. Im Gegensatz zu nicht-VAS exprimierten VAS auch c-jun, ein Protoonkogen, das für den Transkriptionsfaktor AP-1 kodiert. AP-1 bindet an die DNS und hemmt deren Transkription. Eine Mutation von c-jun kann dazu führen, dass AP-1 nicht mehr seine Funktion erfüllen kann und die Zelle entartet. Möglicherweise wird diese Expression von c-jun durch Wachstumsfaktor-produzierende Lymphozyten und durch autokrine Sekretion stimuliert.

In einer anderen Studie (Nieto et al., 2003) wurden 50 VAS immunhistologisch auf die Expression von FGF-2 und TGF $\alpha$  untersucht. Dabei handelte es sich um 41 Fibrosarkome, 8 maligne fibröse Histiozytome und ein Chondrosarkom. Bei 78 % der Fibrosarkome und 63 % der malignen fibrösen Histiozytome, nicht aber bei dem Chondrosarkom, konnte eine

Expression von FGF-2 in den Tumorzellen, nicht aber den Fibroblasten des Stromas oder den Lymphozyten nachgewiesen werden. Neoplastische mehrkernige Riesenzellen waren ebenfalls positiv. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wurde zum Alter der betroffenen Katzen hergestellt: Bei jüngeren Katzen unter 5 Jahren wurde statistisch signifikant häufiger FGF-2 exprimiert als bei älteren Katzen über 11 Jahren. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand auch zwischen hoher Inzidenz von FGF-2-Expression und nodulärem Tumorwachstum in Gegensatz zu infiltrativem Wachstum und zu fehlendem Nachweis von p53-Protein, auf das gleichzeitig untersucht wurde. Ein nicht statistisch signifikanter Zusammenhang wurde zwischen Nekrose und erhöhter FGF-2-Expression beobachtet. 86 % der untersuchten Sarkome wurden positiv auf die Expression von TGF $\alpha$  getestet. Die neoplastischen mehrkernigen Riesenzellen reagierten dabei in einigen Tumoren negativ und in anderen positiv. Eine statistische Signifikanz einer Assoziation von TGF $\alpha$ -Expression mit Alter der Katzen, nekrotischen Arealen im Tumor oder Abwesenheit von Riesenzellen konnte nicht ermittelt werden. Diese Ergebnisse ließen Nieto et al. (2003) vermuten, dass FGF-2 und TGF $\alpha$  verschiedene Bedeutung bei der Entstehung von VAS zukommt.

Carroll (2003) beschäftigte sich mit der Transkription von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen an Impfstellen von Katzen, um Informationen über die Umgebung zu bekommen, in der später möglicherweise VAS entstehen. Untersucht wurde die Transkription von TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10 und TGF $\beta$  relativ zur Transkription von GAPDH als „housekeeping“ Gen bei sechs geimpften Katzen am 21. Tag im Vergleich zu unbehandelter Haut und zu Haut, in die ein steriles Kohlescheibchen eingesetzt worden war. Verwendete Impfstoffe waren ein Totimpfstoff mit Adjuvans auf Aluminiumbasis gegen Tollwut (Rhabdomun<sup>TM</sup>, Pfizer), ein Totimpfstoff mit Adjuvans auf Aluminiumbasis gegen Leukose (Leukozell2<sup>TM</sup>, Pfizer), ein Lebendimpfstoff mit Canary Pox als Vektor gegen Tollwut (Purevax<sup>TM</sup>, Merial) und ein Totimpfstoff ohne Adjuvans auf Aluminiumbasis gegen Protozoen (Fel-O-Vax Giardia<sup>TM</sup>, Fort Dodge Animal Health). Es zeigten sowohl verschiedene Katzen bei demselben Impfstoff als auch dieselbe Katze bei unterschiedlichen Impfstoffen verschiedene Reaktionsmuster. Damit konnte die ursprüngliche Hypothese, dass ein bestimmter Impfstoff bei verschiedenen Katzen ein einheitliches oder ähnliches Zytokinprofil hervorrufen würde, nicht gestützt werden; vielmehr waren die Ergebnisse variabel. Insgesamt ließ sich jedoch feststellen, dass die Transkription der untersuchten Zytokine an den Impfstellen und an den Stellen mit Kohlenstofffremdkörper im Vergleich zum unbehandelten Kontrollgewebe erhöht war. Im Vergleich der Impfstellen untereinander wurden bei dem Totimpfstoff gegen Giardien und

gegen Tollwut die stärkeren Erhöhungen der Transkription gefunden. Möglicherweise ist eine Dysregulation der pro- und inflammatorisch wirkenden Zytokine, deren Transkription an Impfstellen nachgewiesen werden kann, bei bestimmten Katzen an der Entstehung eines VAS beteiligt (Carroll, 2003).

In einer weiteren Studie (Carroll, 2003) wurde die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf VAS-Zelllinien und feline Fibroblasten getestet. Dafür wurden Zellen mehrerer VAS-Zelllinien sowie feline Fibroblasten mit verschiedenen Konzentrationen an TGF $\beta$ , PDGF, FGF-2, EGF und IL-6 inkubiert. Der Effekt wurde durch Messung der DNS-Synthese unter Verwendung eines Tritium-Thymidin-Aufnahme-Essays bestimmt. Dabei förderten PDGF, FGF-2 und EGF die DNS-Synthese, während IL-6 keinen Einfluss darauf hatte. TGF $\beta$  hatte einen stimulierenden oder hemmenden Effekt. Weiterhin wurden auch TGF $\beta$  und PDGF in Kombination getestet. Wurde TGF $\beta$  vor PDGF gegeben, förderte es die DNS-Synthese. Bei Gabe danach hatte es einen hemmenden Effekt. Zusätzlich wurden sowohl Zellen von VAS-Zelllinien als auch feline Fibroblasten in Überständen kultiviert, die von Zellen aus Vakzinationsstellen oder feline Fibroblasten gewonnen worden waren. Der Überstand von feline Fibroblasten hatte keine nachweisbare Wirkung auf die untersuchten Zellen, während bei dem Überstand von Zellen aus Vakzinationsstellen eine Hemmung der DNS-Synthese beobachtet wurde (Carroll, 2003).

Katayama et al. (2004) wiesen die Existenz von PDGF Rezeptor  $\beta$  in 5 VAS-Zelllinien, einer Zelllinie eines nicht-VAS und einer feline Fibroblastenzelllinie nach. Mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib Mesylat, der die Autophosphorylierung des PDGF Rezeptors  $\beta$  verhindert, konnte die Lebensfähigkeit von VAS-Zellen und Zellen eines nicht-VAS in vitro bei gleichzeitiger Stimulierung durch PDGF-BB vermindert werden. Auch in vivo wirkte Imatinib Mesylat hemmend auf das Wachstum von VAS-Zellen: Im xenogenen Nacktmausmodell zeigten die mit Imatinib Mesylat behandelten Mäuse um 76 % kleinere Tumore als die Mäuse der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe. So konnte gezeigt werden, dass der PDGF Rezeptor  $\beta$  eine Rolle beim Wachstum von VAS und nicht-VAS spielt. Auch eine Bedeutung beim Schutz der VAS-Zellen vor Apoptose konnte gezeigt werden (Katayama et al., 2004).

#### **2.4.1.4 Reaktive Sauerstoff-Spezies**

An Lokalisationen chronischer Entzündung finden sich nicht nur größere Mengen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sondern auch Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS). Diese werden physiologischerweise von phagozytisch aktiven Zellen zur Noxenabwehr produziert.

Von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist bekannt, dass sie Superoxidanion und Hydrogenperoxid produzieren (Carroll, 2003). Diese Spezies reagieren zu Peroxynitrit, das mutagene Wirkung besitzt. Da Zellen in chronisch entzündetem Gewebe unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren verstärkt mitotisch aktiv sind, kommt es bei gleichzeitiger Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies gehäuft zu DNS-Schäden in Form von Punktmutationen, Deletionen oder Rearrangements (Coussens und Werb, 2002). Werden diese nicht repariert, weil die Mutation gerade in einem Gen wie z.B. p53 stattgefunden hat, das für die Zellzykluskontrolle zuständig ist, und es so zu einer Dysfunktion kommt, häufen sich die DNS-Schäden und die Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung steigt (Carroll, 2003). Ein Ausschalten von p53 kann in entzündlich infiltriertem Gewebe auch durch „macrophage migration inhibitory factor“ (MIF) erfolgen. MIF wird von Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert und bewirkt eine Unterdrückung der Transkriptionsaktivität von p53 (Coussens und Werb, 2002). Für eine mögliche Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies bei der Entstehung des felines VAS spricht, dass Katzen im Gegensatz zu anderen Tierarten besonders empfindlich auf oxydativen Stress reagieren (Carroll, 2003). So ist gerade felines Hämoglobin sehr empfindlich gegen oxidative Denaturierung (Christopher et al., 1995): Katzen entwickeln z.B. bei Behandlung mit Acetaminophen (Paracetamol) eine Methämoglobinämie und Heinz-Körperchen in den Erythrozyten (Allison et al., 2000; Weiss et al., 1990).

## **2.4.2 Genetische Veränderungen**

Eine Zelle erwirbt die speziellen Eigenschaften, die eine Tumorzelle auszeichnen, meistens direkt oder indirekt durch eine Veränderung des Genoms (Hanahan und Weinberg, 2000). Damit bildet eine genetische Veränderung in der Regel die Grundlage der Entstehung neoplastischer Zellen.

### **2.4.2.1 Aberration der Chromosomenzahl**

Die häufigste genetische Veränderung in Tumoren ist eine Abweichung der Chromosomenzahl (Gagos und Irminger Finger, 2005). Chromosomale Instabilität soll – wie auch andere Arten der genetischen Instabilität – durch Anhäufung von Veränderungen, die einen malignen Phänotyp ausmachen, eine wichtige Rolle bei der „multistep“ Tumorigenese spielen (Miki et al., 2004; Setoguchi et al., 2001). Der Gewinn und Verlust von chromosomalem Material in neoplastischen Zellpopulationen wird als Prozess der Vervielfältigung angesehen, die zum Überleben der fittesten Klone führt (Gagos und Irminger Finger, 2005).

Zytogenetische Untersuchungen an feline Fibrosarkomen wurden von Mayr et al. (1991, 1994, 1996) durchgeführt. In einem Fibrosarkom fanden sie in 80 % der untersuchten Zellen einen normalen Karyotyp von  $2n=38$ . Die restlichen 20 % der Zellen enthielten eine Trisomie des Chromosoms D1 (Mayr et al., 1994). Ein anderes Fibrosarkom war gekennzeichnet durch eine weite Spanne der Chromosomenzahlen von 34 bis 115. Es wies in 69,2 % der Zellen einen ungefähr triploiden Chromosomensatz zwischen 51 und 64 auf. In dieser Gruppe traten viele verschiedene Monosomien, Disomien, Trisomien, Tetrasomien bis hin zu Heptasomien wie z.B. zahlreiche Kopien von Chromosom C2, E2 und E3 und einzelne Kopien von Chromosom A1, B1 und C1 auf. Zusätzlich wurde in dieser Gruppe das Vorkommen von zwei Riesenchromosomen beobachtet (Mayr et al., 1991). Beide Fibrosarkome stammten von einer Impflokalisation (interskapular), weshalb es sich vermutlich um VAS handelte. Jedoch wird nicht angegeben, ob eine Untersuchung auf FeLV-Antigen erfolgte.

In einer weiteren Studie wurden vier Fibrosarkome mit ebenfalls unbekanntem FeLV-Status untersucht (Mayr et al., 1996). Zwei davon waren an der Schulter lokalisiert und damit möglicherweise VAS. Eins wies in 42 von 50 Metaphasen einen normalen Karyotyp auf; in den restlichen war eine reziproke Translokation  $t(A2q; E3q)$  zu erkennen. Das zweite Fibrosarkom besaß in 12 von 40 Metaphasen ein großes Markerchromosom F1, das in sieben Metaphasen zusätzlich zu zwei normalen F1 Chromosomen unter Verlust einer Kopie von E3 auftrat. Natur und Herkunft des zusätzlichen Materials des Markerchromosoms F1 konnten nicht geklärt werden. Die restlichen 28 Metaphasen waren von normalem Karyotyp.

Während die oben genannten Studien nur geringe Fallzahlen umfassten, untersuchten Thomas et al. (2009) mittels arraybasierter vergleichender Genomhybridisierung 46 feline Sarkome, davon 19 VAS. Sie fanden eine große Anzahl verschiedener Abweichungen des normalen Chromosomenstatus; dabei handelte es sich jedoch nicht um auffällig häufig vorkommende Gewinne und/oder Verluste von ganzen Chromosomen oder Chromosomenarmen, sondern vielmehr um Gewinne und/oder Verluste von Genloci an einzelnen Chromosomen. Verluste kamen dabei deutlich häufiger vor als Gewinne, wobei 74 der 210 untersuchten Loci besonders häufig betroffen waren (Thomas et al., 2009). Diese waren über alle 18 Autosomen verteilt. Es wurden 2 Genomregionen gefunden, an denen Deletionen bei nicht-VAS signifikant häufiger auftraten als bei VAS.

In einer mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in P2 untersuchten VAS-Zelllinie wurden zahlreiche chromosomale „Rearrangements“ nachgewiesen (Thomas, 2009). Ein Genlocus von D1 trat bei einigen Zellen an bis zu 16 verschiedenen Chromosomen auf. Von weiteren Loci gab es bis zu 15 Kopien. Ein anderer Locus von D1 fehlte ganz oder war nur auf einem

von zwei Chromosomen vorhanden. Insgesamt fiel auf, dass zwischen verschiedenen Zellen derselben Tumorzelllinie große Unterschiede bestanden.

#### **2.4.2.2 Veränderung an Reparaturgenen**

Jede Zelle verfügt über eine Vielzahl von Schutzmechanismen zur Überwachung der Integrität der DNS und deren Reparatur im Fall einer Schädigung. Sie sorgen dafür, dass Mutationen nur sehr selten stattfinden und die genetische Stabilität gewahrt bleibt. Damit es überhaupt gehäuft zu solchen Mutationen kommen kann, die einen malignen Phänotyp ausmachen, wird vermutet, dass eine gestörte Funktion eines Schutzmechanismus zugrunde liegt (Hanahan und Weinberg, 2000; Lengauer et al., 1998).

Gegenstand der Forschung an VAS waren deshalb auch genetische Veränderungen solcher Schutzmechanismen, insbesondere des Gens für p53. Dieses Gen codiert für den multifunktionalen Transkriptionsfaktor p53, der die Bildung von Tochterzellen mit irreparabel geschädigter DNS durch Induktion von Apoptose der entsprechenden Zellen verhindert (Nambiar et al., 2001). Bei weniger gravierendem Schaden der DNS sorgt p53 für eine Arretierung der Zellteilung, damit eine Reparatur erfolgen kann. Sowohl bei Tieren als auch bei Menschen konnten Mutationen in diesem Gen mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden (Greenblatt et al., 1994). Bei 60 % aller humanen Tumoren ist das Gen für p53 mutiert (Levine et al., 1991). Nambiar et al. (2001) fanden in 40 % der von ihnen untersuchten VAS einen Hinweis auf eine Mutation des Gens für p53.

Mayr et al. (2000) entdeckten in 3 von 30 untersuchten Fibrosarkomen Mutationen des Gens für p53. Der niedrige Anteil von 10 % erklärt sich möglicherweise dadurch, dass in der Studie nur die Exons 4 bis 8 berücksichtigt und damit nicht unbedingt alle Mutationen erfasst wurden. Die Mutationen fanden sich nur lokal in den Tumorproben, jedoch nicht im peripheren Blut. Ein solches Ergebnis spricht dafür, dass keine Keimbahnmutation, sondern eine somatische Mutation stattgefunden hat (Mayr et al., 1998a).

Auf eine Mutationsrate von 81 % kamen dagegen Hershey et al. (2005): Sie konnten mittels Immunhistologie in 65 von 80 VAS mutiertes p53 nachweisen. In diesen Fällen beobachteten sie zusätzlich eine positive Reaktion auch in morphologisch unverändert erscheinenden mesenchymalen Zellen der Tumorperipherie.

Überwiegend wurde in den Studien (Hershey et al., 2005; Nambiar et al., 2001) ein recht hoher Prozentsatz an Veränderungen des Gens für p53 gefunden. Veränderungen des Gens für p53 können dazu führen, dass weitere Mutationen, die in anderen Genen stattfinden, nicht repariert werden und damit ein maligner Phänotyp entsteht.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Als Ausgangsmaterial wurden Tumoren von Katzen verwendet, bei denen die behandelnden Tierärzte aufgrund der Lokalisation an Vakzinationsstellen und der derben Konsistenz präoperativ die Verdachtsdiagnose VAS stellten. In die Untersuchungen einbezogen wurden 5 Tumoren, die sich histologisch/immunhistologisch als VAS darstellten und von denen permanente Zelllinien etabliert werden konnten (T1-T5), sowie Zellen der gewonnenen Linien (L1-L5).

Die durchgeführten Untersuchungsverfahren sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

**Tabelle 3.1: Zusammenstellung der durchgeführten Untersuchungsverfahren**

Untersuchungs-material	Vergleichs-material	Untersuchungsparameter	Nachweisverfahren
Tumoren T1-T5		Morphologie	Histologie (H.E., Goldner)
		$\alpha$ -SMA, Vimentin, Desmin, Zytokeratin, MHC II, FeLV	Immunhistologie
		TRAP	Enzymhistochemie
		FeLV	PCR
		TNF, IL-1 $\beta$ , FGF-2, TGF $\beta$ 1, EGF, PDGF	Real-time RT- PCR
	Unterhaut	Morphologie	Histologie (H.E.)
		FeLV	PCR
		TNF, IL-1 $\beta$ , FGF-2, TGF $\beta$ 1, EGF, PDGF	Real-time RT- PCR

(Fortsetzung s. nächste Seite)

Tabelle 3.1 (Fortsetzung)

Untersuchungs- material	Vergleichs- material	Untersuchungsparameter	Nachweisverfahren
Zellen L1-L5		Morphologie	Inversionsmikroskop, Rasterelektronen- mikroskop, Zytologie (H.E., Goldner)
		Chromosomen	Chromosomenanalyse
		$\alpha$ -SMA, Vimentin, Desmin, Zytokeratin, MHC II, FeLV	Immunzytologie
		TRAP	Enzymzytochemie
		FeLV	PCR
		TNF, IL-1 $\beta$ , FGF-2, TGF $\beta$ 1, EGF, PDGF	Real-time RT- PCR
	Kultivierte Hautfibro- blasten	Morphologie	Phasenkontrast- mikroskop, Zytologie (H.E., Spezialfärbung)
		$\alpha$ -SMA, Vimentin, Desmin, Zytokeratin, MHC II, FeLV	Immunzytologie
		FeLV	PCR
		TNF, IL-1 $\beta$ , FGF-2, TGF $\beta$ 1, EGF, PDGF	Real-time RT-PCR

### 3.1.1 Tumoren

#### 3.1.1.1 Gewinnung und Erstverarbeitung

Die Tumoren wurden als unfixierte, möglichst keimfrei entnommene Operationspräparate bei Tierarztpraxen im Umkreis von 100 km des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gesammelt. Direkt post operationem erfolgte eine Aufteilung der Tumoren in eine Probe für das Anlegen einer Zelllinie, eine Probe für die Formalinfixierung und – je nach Größe des Tumors – eine oder mehrere Proben für Gefrierblöcke. Zur

Gewinnung der Probe für das Anlegen einer Zelllinie wurde aus möglichst nicht nekrotischen oder stark blutig durchtränkten Bezirken des Tumors mit steriler Pinzette und Skalpellklinge eine ca. 0,4 cm dicke Scheibe entnommen, in 70 %igem Alkohol geschwenkt und in eine 100 ml Glasflasche mit ca. 40 ml Medium (DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 50 µg/ml Gentamicin, alles PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verbracht. Als Probe für die Formalinfixierung wurde eine ca. 0,4 cm dicke Scheibe des Tumors im Querschnitt entnommen und in 10 %iges, ungepuffertes Formalin (s. Anhang) gegeben. Das restliche Tumorgewebe diente für Gefrierblöcke, wurde in Würfel mit einer Kantenlänge von 0,5 bis 1 cm geschnitten und einzeln in Gefrierbeutel verpackt.

Der Transport der nicht in Formalin verbrachten Proben zum Institut erfolgte in einer Styroporkiste mit bei -20 °C vorgekühlten Kühlelementen und dauerte höchstens 90 Minuten.

### **3.1.1.2      Bearbeitung des formalinfixierten Materials**

Die in Formalin gegebenen Tumorscheiben wurden über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und anschließend routinemäßig in Paraffin (Schmelzpunkt 56-58 °C; Vogel GmbH & Co KG, Gießen) eingebettet. Von den eingebetteten Scheiben wurden ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Starfrost®-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen und mit Hämatoxilin-Eosin (H.E.) oder nach Goldner gefärbt. Für die Immunhistologie und Enzymhistochemie wurden ca. 3 µm dicke Schnitte hergestellt, auf SuperfrostPlus® Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen, einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank (5 °C) aufbewahrt.

### **3.1.1.3      Auswertung der Histologie**

Alle Tumoren wurden mikroskopisch an H.E.-gefärbten Schnitten untersucht und nach dem bereits auf VAS angewendeten Schema (Couto et al., 2002) anhand von Zelldifferenzierung, Nekrose und Mitoserate in Grade eingeteilt. Dabei wurden folgende Kriterien verwendet: Es wurden jeweils die Zahlen 1 bis 3 vergeben für Zelldifferenzierung (1 = Tumorzellen ähneln reifen, ausdifferenzierten Zellen; 2 = Tumorzellen haben einen mäßig differenzierten Phänotyp; 3 = schlecht differenzierte Zellen), Nekrose (1 = keine Nekrose; 2 = Nekrose bei weniger als 50 % der gesamten Tumorfläche; 3 = Nekrose bei mindestens 50 % der gesamten Tumorfläche) und Mitoserate (1 = 1-9 Mitosen pro 10 „high power fields“ (HPF); 2 = 10-19 Mitosen pro 10 HPF; 3 = 20 oder mehr Mitosen pro 10 HPF). Die vergebenen Zahlen wurden addiert. Eine Summe von 3 oder 4 entsprach Grad I, eine

Summe von 5 oder 6 entsprach Grad II und eine Summe von 7, 8 oder 9 entsprach Grad III. Weiterhin wurde der Grad der entzündlichen Infiltration nach den von Couto verwendeten Kriterien eingestuft. Dazu wurde insbesondere der Tumorrand durchgemustert und subjektiv beurteilt. Wenn nur vereinzelt Entzündungszellen zu erkennen waren, galt dies als geringgradig. Eine mittelgradige entzündliche Infiltration lag vor, wenn weniger als die Hälfte des Tumorrandes von Entzündungszellen umgeben war. Für eine hochgradige entzündliche Infiltration musste mindestens die Hälfte des Tumorrandes von Entzündungszellen umgeben sein. Zusätzlich wurde auf das Vorhandensein von mehrkernigen Riesenzellen und Blutungen untersucht. Der Gehalt an Kollagenfasern wurde in der Goldner-Färbung geschätzt und wie folgt beurteilt:

- + / - vereinzelt kollagene Fasern ( $> 0 \leq 10$  % des Gewebeanschnitts)
- + wenige kollagene Fasern ( $> 10 \leq 30$  % des Gewebeanschnitts)
- ++ mittlerer Gehalt an kollagenen Fasern ( $> 30 \leq 50$  % des Gewebeanschnitts)
- +++ viele kollagene Fasern ( $> 50$  % des Gewebeanschnitts).

#### **3.1.1.4 Herstellung und Bearbeitung der Gefrierblöcke**

Für die Herstellung von Gefrierblöcken wurden die zuvor gefertigten Tumorwürfel in selbst hergestellte Hütchen aus Aluminiumfolie (Bodendurchmesser ca. 1,5 cm) gelegt, mit Tissue Tec<sup>®</sup> (O.C.T.<sup>TM</sup> Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Zouterwoude, Niederlande) übergossen und in durch flüssigen Stickstoff in einer umgebenden Kammer auf seinen Gefrierpunkt gekühltes flüssiges Isopentan (2-Methyl-Butane; Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze) schockgefroren. Die Gefrierblöcke wurden anschließend in Gefrierbeutel verpackt bei -80 °C gelagert.

Zur RNS-Isolierung für die Real-time-PCR wurden insgesamt je 10 mg Gewebe als 20 µm dicke Schnitte (2700-Frigocut, Reichert-Jung/Lahntechnik GmbH), von denen das Tissue Tec<sup>®</sup> möglichst gut entfernt worden war, in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Zwischendurch wurde von den Gefrierblöcken an für das zur Extraktion bestimmte Gewebe repräsentativer Stelle je ein ca. 10 µm dicker Schnitt angefertigt, für 10 Minuten in reinem Azeton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) fixiert, luftgetrocknet und mit H.E. gefärbt.

Zur DNS-Isolierung für die PCR zum Test auf eine FeLV-Infektion wurden insgesamt je 10 mg Gewebe als 20 µm dicke Schnitte (2700-Frigocut, Reichert-Jung, Nußloch), von denen das Tissue Tec<sup>®</sup> möglichst gut entfernt worden war, in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Biozym

Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.1.2 Zelllinien**

#### **3.1.2.1 Anlage und Versorgung der Primärkulturen**

Die nachfolgenden Schritte wurden in einer Reinraumwerkbank (LaminAir, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) mit sterilen Instrumenten durchgeführt. Die Tumorscheiben wurden den Transportflaschen entnommen, in eine sterile Petrischale verbracht und mittels steriler Pinzette und Skalpellklinge in kleine Stücke mit einem Durchmesser von 1 bis 2 Millimetern geteilt. Bei 1 bis 2 (je nach Probenmenge) 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (IWAKI, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) wurden mit einer erhitzten anatomischen Pinzette 16 Vertiefungen in den Boden geschmolzen und in jede Vertiefung wurde ein Tumorstückchen gelegt (Baumgärtner et al., 1982). Gegebenenfalls vorhandene, restliche Tumorstückchen wurden mit einer Skalpellklinge noch feiner zerkleinert und in eine weitere Kulturflasche gegeben. In jede Flasche wurden tropfenweise ca. 1,5 ml Medium (DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 50 µg/ml Gentamicin, alles PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gegeben, so dass die Tumorstückchen gerade benetzt waren. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank (Function line™, Begasungsbrutschrank Typ B5060 EK CO<sub>2</sub>, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) mit CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) bei 37 °C. Am folgenden Tag wurden tropfenweise weitere 1,5 ml Medium zugegeben und am Tag danach wurde noch einmal 1 ml zugegeben. Zweimal pro Woche wurde die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt. Die erste Passage erfolgte bei Ausbildung eines konfluenten Monolayers, spätestens aber nach 3 Wochen, selbst wenn zu diesem Zeitpunkt noch kein Monolayer vorhanden war. Dazu wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt und die Kultur mit 2 ml Medium ohne FKS gespült. Nach erneutem Absaugen wurde die Kultur mit 2 ml 1 × Trypsin-EDTA (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) überschichtet und für ca. 5 Minuten im Brutschrank (Function line™, Begasungsbrutschrank Typ B5060 EK CO<sub>2</sub>, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) mit CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) bei 37 °C inkubiert. Nach makroskopisch festgestellter Ablösung der Zellen (sichtbar als Trübung oder kleine Flöckchen) wurden 2 ml Medium mit FKS hinzugegeben, die Gesamtflüssigkeit in ein steriles 12 ml Reagenzglas überführt, mit einem Aluhütchen abgedeckt und für 5 Minuten bei 400 × g und 12 °C zentrifugiert (Rotina 48 RC, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und auf 2 neue Kulturflaschen aufgeteilt. Jede Flasche

wurde mit Medium auf 4 ml aufgefüllt und im Brutschrank (Function line™, Begasungsbrutschrank Typ B5060 EK CO<sub>2</sub>, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) mit CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) bei 37 °C inkubiert.

### **3.1.2.2 Kultur der Zelllinien**

Bis die Linien ein stabiles Wachstum zeigten und auch nach Passage einen konfluenten Monolayer bildeten, wurden sie in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit je 4 ml Medium kultiviert, das zweimal pro Woche je zur Hälfte gewechselt wurde. Danach wurden sie in 5 ml Medium weitergeführt, das einmal pro Woche vollständig gewechselt wurde. Das Passagieren erfolgte dann in 3 bis 4-tägigem Abstand zum Mediumwechsel ebenfalls einmal pro Woche. Dabei wurde wie oben beschrieben (siehe 3.1.2.1) vorgegangen mit der Änderung, dass von den resuspendierten Zellen nur 1-2 Tropfen (ca. 300.000 Zellen) in eine neue Kulturflasche gegeben wurden und diese mit 5 ml Medium aufgefüllt wurde. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) bei 37 °C.

### **3.1.2.3 Kryokonservierung von Zellen**

Um Zellreserven anzulegen, wurden nach Etablierung der Linien sowie danach in größeren Abständen (ca. alle 3-6 Monate) Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen nach der Passage (siehe 3.1.2.1) zunächst in 3 ml Medium resuspendiert.

Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen) wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit so viel Einfriermedium (s. Anhang) versetzt, dass 2-3 Millionen Zellen pro Milliliter enthalten waren. Als Einfriermedium diente das Kulturmedium, welches mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) versetzt worden war. Je ca. 1 ml dieser Suspension wurde in 1,8 ml Kryoröhrchen (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) gefüllt und in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox (NALGENE™ Cryo 1 °C Freezing container, Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) bei -30 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte das Umsetzen in flüssigen Stickstoff. Nach ca. einer Woche wurden die Zellen eines Röhrchens von jeder Charge aufgetaut, in Kultur genommen und auf ihre Lebensfähigkeit überprüft.

### **3.1.2.4 Kultur in Chamberslides**

Zur genauen morphologischen Untersuchung wurden Zellen aller Linien in Chamberslides (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) kultiviert. Dazu wurden ca. 200.000 Zellen pro Kammer in 1 ml Medium eingesät und im Brutschrank mit CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) bei

37 °C inkubiert. Wenn 1/2 bis 2/3 des Bodens mit Zellen bewachsen war, wurde das Medium abgesaugt, der Plastikaufsatz entfernt, die Kammer bei Raumtemperatur luftgetrocknet und Pappenheim gefärbt.

### **3.1.2.5 Pelletherstellung für die Immunzytologie/ Enzymzytochemie**

Zur Gewinnung von Pellets für die Zytologie, Immunzytologie und Enzymzytochemie wurden die Linien in jeweils drei 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit einem Silikonschaber abgeschabt, nacheinander in ca. 1,2 ml Medium ohne FKS aufgenommen und in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) überführt. Danach erfolgten Zentrifugation bei 3000 UpM für 7 Minuten (Hettich Mikroliter Zentrifuge Typ 2022, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen), Absaugen des Überstandes und Fixierung der Pellets bei Raumtemperatur über Nacht in 10 %igem Formalin (s. Anhang). Anschließend wurden die Pellets routinemäßig in Paraffin (Schmelzpunkt 56-58 °C; Vogel GmbH & Co KG, Gießen) eingebettet. Von diesen wurden ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Starfrost<sup>®</sup>-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen und mit H.E. oder nach Goldner gefärbt. Für die Immunzytologie und die Enzymzytochemie wurden ca. 3 µm dicke Schnitte hergestellt, auf SuperFrost<sup>®</sup>/Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen, einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank (5 °C) aufbewahrt.

### **3.1.2.6 Auswertung von Wachstumsverhalten, Morphologie und Zytologie**

Vor jeder Behandlung wurden die Zellen sämtlicher Kulturflaschen mikroskopisch im Hinblick auf Morphologie, Zelldichte und Wachstumsverhalten untersucht (Inversionsmikroskop Olympus IX70-58F, Olympus, Deutschland). Die Auswertung der Zytologie erfolgte an den Chamberslide-Präparaten. Dabei wurde die Morphologie deskriptiv dargestellt.

### **3.1.2.7 Herstellung von Präparaten für das Rasterelektronenmikroskop (REM)**

Für die Herstellung von Präparaten für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Zellen aller Linien wie unter 3.1.2.2 beschrieben in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gezogen. Wenn etwa 2/3 des Flaschenbodens bedeckt war, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 2,5 %igem Glutaraldehyd (s. Anhang) fixiert und bis zur Weiterverwendung (innerhalb einer

Woche) im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Viermaliges Spülen in Kakodylatpuffer (Gebrauchslösung, s. Anhang)
2. Nachfixierung mit 1 %igem Osmiumtetroxyd ( $\text{OsO}_4$ , s. Anhang), 30 bis 40 Minuten
3. Viermaliges Spülen in Kakodylatpuffer (Gebrauchslösung, s. Anhang)
4. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (1-Propanol; 1-Propanol > 99,5 %ig, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) in den Konzentrationsstufen 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % für jeweils 10 Minuten, abschließend dreimalige Entwässerung in 100 %igem 1-Propanol für jeweils 10 Minuten

Nach der letzten Entwässerungsstufe wurde der Boden der Zellkulturflasche zunächst mit einer heißen Mikrotomklinge in drei etwa gleich lange Streifen und schließlich in Stücke von ca. 1 cm × 1 cm Kantenlänge zerschnitten. Im Folgenden wurden diese Stücke mit einer Pinzette nur am Kantenrand gefasst und es wurde immer darauf geachtet, dass die mit Zellen bewachsene Fläche nach oben zeigte. Der Boden der Kulturflasche war jederzeit von Flüssigkeit bedeckt.

Die Trocknung erfolgte im Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung (E3000 Series II, Polaron Equipment Limited, Watford Hertfordshire, Großbritannien).

Jeweils drei Stücke wurden – bedeckt von 100 %igem 1-Propanol – in den Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung überführt.

Durch mehrmaliges Spülen mit Flüssig- $\text{CO}_2$  (Steigrohr- $\text{CO}_2$  flüssig, Messer Group GmbH, Sulzbach) wurde das 1-Propanol durch das flüssige  $\text{CO}_2$  ersetzt: Insgesamt wurde im Abstand von 15 Minuten viermal gespült, wobei jeder Spülgang daraus bestand, das  $\text{CO}_2$ -Propanolgemisch viermal zur Hälfte abzulassen und dann reines Flüssig- $\text{CO}_2$  nachzufüllen.

Am Schluss wurde die Temperatur im Apparat auf ca. 40 °C erhöht.

Bei dieser Temperatur geht das  $\text{CO}_2$  in die Gasphase über, ohne eine Phasengrenze zu bilden, so dass das Gewebe weitestgehend geschont wird. Gleichzeitig steigt auch der Druck im Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung.

Das durch die Temperaturerhöhung gasförmig gewordene  $\text{CO}_2$  wurde langsam abgelassen bis der Druck im Apparat normales Niveau erreicht hatte.

Die Zellkulturflaschenboden-Stücke wurden mit einem dünnen Film Graphitkleber (Colloidal Graphite, Isopropanol base, Taab Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, England) auf Stiftprobenteller (Plano GmbH, Wetzlar) geklebt.

Die Präparate wurden über Nacht – staubsicher abgedeckt – im Trocknungsschrank bei 40 °C getrocknet.



Am folgenden Tag wurden sie in einer Sputteranlage (Sputter Anlage, Balzers Union Ltd., Liechtenstein) im Vakuum (0,1 Torr) bei einer Spannung von 65 V und einem Strom von ca. 17 mA für 4 Minuten mit Goldatomen gesputtert (Prinzip der Kathodenzerstäubung), um die Leitfähigkeit zu erhöhen. Die Präparate wurden in passenden, vor Staub geschützten Platten in Gegenwart eines Trocknungsmittels (Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator [Blaugel], Merck KGaA, Darmstadt) im Trockenschrank bei 40 °C aufbewahrt.

### 3.1.2.8 Betrachtung der Präparate im REM

Die Betrachtung der Präparate fand im REM (Typ DSM 940, Carl Zeiss AG, Oberkochen) statt. Es galten folgende Einstellungen für die Betrachtung:

Spannung	15 kV
Arbeitsabstand	15-16 mm
Vergrößerungen	200-1000fach
Einscanngeschwindigkeit zur Betrachtung und für Fotos	16 Sekunden, 32 Sekunden oder 60 Sekunden

Es wurde die Morphologie der Zellen beurteilt.

### 3.1.3 Kontrollen

Als Kontrolle wurde Unterhaut von drei frishtoten Katzen, die zur Sektion abgegeben worden waren, sowie daraus gezüchtete Zellen verwendet. Die Haut der Katzen wurde im Bereich zwischen den Schulterblättern bis seitlich am Thorax rasiert und mittels steriler Schere und Pinzette mit Unterhaut bis zur ersten Muskelschicht vom Tierkörper entfernt.

Eine Scheibe im Querschnitt wurde in ein Plastikgefäß mit Formalin (s. Anhang) gegeben, über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und anschließend routinemäßig in Paraffin (Schmelzpunkt 56-58 °C; Vogel GmbH & Co KG, Gießen) eingebettet. Von den eingebetteten Scheiben wurden ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit H.E. gefärbt sowie für die Immunhistologie 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf SuperFrost®/Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Ein Hautstück von jeder Katze in der Größe von ca. 4 × 3 cm wurde in 70 %igem Alkohol geschwenkt und in eine 100 ml Glasflasche mit ca. 40 ml Medium (DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 50 µg/ml Gentamicin, alles PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gelegt. Die Weiterverarbeitung erfolgte in einer Reinraumwerkbank mit sterilen Instrumenten. Die Hautstücke

wurden den Transportflaschen entnommen und in eine sterile Petrischale verbracht. Mittels steriler Pinzette und Skalpellklinge wurden von der Unterseite der Hautstücke kleine Stücke mit ca. 1-2 mm Durchmesser entnommen und in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche gelegt. Die weitere Versorgung erfolgte wie unter 3.1.2.1 für die Primärkulturen der Tumoren beschrieben. Die Pelletherstellung für die Immunzytologie erfolgte wie unter 3.1.2.5 beschrieben.

Die restliche Haut wurde flach auf Alufolie gelegt, eingewickelt, mit einem flachen Glasstück, das ebenfalls in die Alufolie eingewickelt wurde, stabilisiert, in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die DNS- bzw. RNS-Extraktion wurden je 10 mg Gewebe als 20 µm dicke Schnitte in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Dabei wurden die Hautstücke von der Unterseite her flach angeschnitten, um möglichst viel Unterhautgewebe und keine Epidermis zu bekommen.

### 3.2 Immunhistologie/Immunzytologie

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über Primär- und Sekundärantikörper, Verdünnung, immunhistologische Nachweismethode, Vorbehandlungsmethode, Sera zum Blocken und Bezugsquellen.

**Tabelle 3.2: Primärantikörper, Bezugsquelle, Verdünnung, immunhistologische Nachweismethode, Vorbehandlungsmethode und Sera zum Blocken**

<b>Antikörper/Klon</b>	<b>Bezugsquelle [Bestellnummer]</b>	<b>Verdünnung, Methode</b>	<b>Vorbehandlung, Blocken</b>
Maus anti-gp70 (Klon C11D82i)	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, CA., USA	1:200 in TBS/20 % SS, IPO	TUF <sup>®</sup> , 20 % SS
Maus anti-p27 (Klon PF12J-10A)	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, CA., USA	1:100 in TBS/20 % SS, IPO	TUF <sup>®</sup> , 20 % SS
Maus anti-humanes Glattmuskelaktin (Klon 1A4)	Dako Diagnostika GmbH; Hamburg [M 0851]	1:400 in TBS/BSA, ABC	Zitratpuffer pH 6,0 100 % PS

(Fortsetzung s. nächste Seite)

**Tabelle 3.2 (Fortsetzung)**

<b>Antikörper/Klon</b>	<b>Bezugsquelle [Bestellnummer]</b>	<b>Verdünnung, Methode</b>	<b>Vorbehandlung, Blocken</b>
Maus anti-humanes Vimentin (Klon: V9)	Dako Diagnostika GmbH; Hamburg [M 0725]	1:50 in TBS ABC	keine VB 20 % PS
Maus anti-humanes Desmin (Klon: D33)	Dako Diagnostika GmbH; Hamburg [M 760]	1:800 in TBS ABC	keine VB 20 % PS
Maus anti-Keratin Pan Ab 3 (Klon Lu-5)	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach [M5-747-R7]	1:20 in TBS PAP	Protease Typ XXIV 10 % RS
Maus anti-human HLA-DR ( $\alpha$ -Kette von MHC II) (Klon TAL.1B5)	Dako Diagnostika GmbH; Hamburg [M 0746]	1:25 in TBS PAP	Zitratpuffer pH 6,0 10 % RS

Erläuterung der Abkürzungen: SS: Schweineserum; PS: Pferdeserum; IPO: indirekte Immunperoxidase; RS: Rattenserum; ABC: Avidin-Biotin-Komplex; PAP: Peroxidase-Antiperoxidase; VB: Vorbehandlung

**Tabelle 3.3: Sekundärantikörper, Bezugsquelle, Verdünnung**

<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle [Bestellnummer]</b>	<b>Verdünnung</b>
Kaninchen anti-Maus IgG-PO	DAKO Diagnostika GmbH; Hamburg [P0161]	1:100 in TBS/20 % SS
Pferd anti-Maus IgG , biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA [BA-2000]	1:100 in TBS
Ratte anti-Maus IgG (H&L)	Dianova GmbH, Hamburg [415005100]	1:100 in TBS

### 3.2.1 Nachweis von FeLV-Antigenen

Der Nachweis der FeLV-Antigene erfolgte mittels der indirekten Immunperoxidase (IPO)-Technik (Reinacher und Theilen, 1987).

Dabei wurde ein 1:1 Gemisch zweier monoklonaler Maus-Primärantikörper gegen die FeLV-Strukturproteine gp70 (1:200 in TBS) und p27 (1:100 in TBS) verwendet. Zur Detektion wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper genutzt (siehe Tabelle 3.2). Die Negativkontrollschnitte wurden primär mit einem monoklonalen Antikörper (T1) gegen ein Oberflächenantigen von T-Lymphozyten des Huhnes inkubiert (Hirschberger, 1987). Alle Inkubationsschritte wurden, soweit nichts anderes vermerkt ist, bei Raumtemperatur durchgeführt.

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 10 Minuten; Entfernung des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2 × Isopropylalkohol, 1 × 96 % Alkohol, 1 × 80 % Alkohol für je 3 Minuten)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,5 % frisch zugesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a.; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 30 Minuten
- 3) Waschen der Schnitte mit TBS (s. Anhang)
- 4) TUF<sup>®</sup>-Behandlung
  - 5 Minuten Aqua dest.
  - 10 Minuten Inkubation bei 97 °C in vorgewärmtem TUF<sup>®</sup> im Wasserbad (Typ 1013; Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GfL), Burgwedel)
  - 15 Minuten Abkühlen in TUF<sup>®</sup> bei Raumtemperatur
  - 5 Minuten Aqua dest.
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates<sup>™</sup> (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates<sup>™</sup> in die Halterung
- 6) Inkubation mit 20 % Schweineserum in TBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 7) Auftragen des Primärantikörpers Maus anti-FeLV gp70 (1:200 in TBS/BSA) und p27 (1:100 in TBS/BSA) oder des Kontrollantikörpers T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) in der gleichen Verdünnung (Negativkontrollschnitte); Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C; 3 × Spülen der Schnitte für je 5 Minuten durch Einbringen von ca. 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>
- 8) Auftragen des Sekundärantikörpers Kaninchen anti-Maus IgG-PO (1:100 in TBS mit 20 % Schweineserum); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur;

2 × 5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>, Entnahme aus den Coverplates<sup>TM</sup>

- 9) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. oben) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 10) Waschen der Schnitte 3 × für je 5 Minuten in TBS und 1 × für 5 Minuten in Aqua dest.
- 11) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für etwa 10 Sekunden; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 12) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 13) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

### 3.2.2 Nachweis von $\alpha$ -smooth muscle actin

Der Nachweis von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) erfolgte mittels eines kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpers gegen humanes Glattnuskelaktin. Es wurde die ABC-Methode angewandt.

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 10 Minuten; Entfernung des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2 × Isopropylalkohol, 1 × 96 % Alkohol, 1 × 80 % Alkohol für je 3 Minuten)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,5 % frisch zugesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a.; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 30 Minuten
- 3) Waschen der Schnitte mit TBS (s. Anhang)
- 4) Zitratpuffer-Behandlung: Erhitzen von 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0, s. Anhang) in Plastikkuvetten im Wasserbad (Typ 1013; Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GfL), Burgwedel) auf 97 °C; Inkubation der Schnitte in den Küvetten bei 97 °C für 20 Minuten; anschließendes Abkühlen der Schnitte in den Küvetten außerhalb des Wasserbades für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates<sup>TM</sup> (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates<sup>TM</sup> in die Halterung
- 6) Inkubation mit 100 %igem Pferdeserum in TBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur

- 7) Auftragen des Primärantikörpers Maus anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (1:400 in TBS/BSA) oder des Kontrollantikörpers T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) in der gleichen Verdünnung (Negativkontrollschnitte); Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C; 3  $\times$  Spülen der Schnitte für je 5 Minuten durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>
- 8) Auftragen des Sekundärantikörpers Pferd anti-Maus IgG (Ansatz: 9  $\mu$ l in 1 ml TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3  $\times$  5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>
- 9) Auftragen des ABC-Komplexes (Ansatz: 9  $\mu$ l A + 9  $\mu$ l B für 1 ml TBS 30 Minuten vor Gebrauch); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3  $\times$  5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>, Entnahme aus den Coverplates<sup>TM</sup>
- 10) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. oben) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 11) Waschen der Schnitte 3  $\times$  für je 5 Minuten in TBS und 1  $\times$  für 5 Minuten in Aqua dest.
- 12) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für etwa 10 Sekunden; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 13) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 14) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

### 3.2.3 Nachweis von Vimentin

Der Nachweis von Vimentin erfolgte mittels eines kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpers gegen humanes Vimentin. Es wurde die ABC-Methode angewandt.

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 10 Minuten; Entfernung des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2  $\times$  Isopropylalkohol, 1  $\times$  96 % Alkohol, 1  $\times$  80 % Alkohol für je 3 Minuten)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,5 % frisch zugesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a.; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 30 Minuten
- 3) Waschen der Schnitte mit TBS (s. Anhang)

- 4) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates<sup>TM</sup> (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates<sup>TM</sup> in die Halterung
- 5) Inkubation mit 20 % Pferdeserum in TBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 6) Auftragen des Primärantikörpers Maus anti-Vimentin (1:50 in TBS) oder des Kontrollantikörpers T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) in der gleichen Verdünnung (Negativkontrollschnitte); Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>
- 7) Auftragen des Sekundärantikörpers Pferd anti-Maus IgG (Ansatz: 9 µl in 1 ml TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3 × 5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>
- 8) Auftragen des ABC-Komplexes (Ansatz: 9 µl A + 9 µl B für 1 ml TBS 30 Minuten vor Gebrauch); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3 × 5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>, Entnahme aus den Coverplates<sup>TM</sup>
- 9) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. oben) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 10) Waschen der Schnitte 3 × für je 5 Minuten in TBS und 1 × für 5 Minuten in Aqua dest.
- 11) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für etwa 10 Sekunden; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 12) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 13) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

### 3.2.4 Nachweis von Desmin

Der Nachweis von Desmin erfolgte mittels eines kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpers gegen humanes Desmin. Es wurde die ABC-Methode angewandt.

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 10 Minuten; Entfernung des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2 × Isopropylalkohol, 1 × 96 % Alkohol, 1 × 80 % Alkohol für je 3 Minuten)

- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,5 % frisch zugesetztem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Perhydrol<sup>®</sup> 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  p.a.; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 30 Minuten Waschen der Schnitte mit TBS (s. Anhang)
- 3) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates<sup>™</sup> (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates<sup>™</sup> in die Halterung
- 4) Inkubation mit 20 % Pferdeserum in TBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 5) Auftragen des Primärantikörpers Maus anti-Desmin (1:800 in TBS) oder des Kontrollantikörpers T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) in der gleichen Verdünnung (Negativkontrollschnitte); Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>
- 6) Auftragen des Sekundärantikörpers Pferd anti-Maus IgG (Ansatz: 9 µl in 1 ml TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3 × 5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>
- 7) Auftragen des ABC-Komplexes (Ansatz: 9 µl A + 9 µl B für 1 ml TBS 30 Minuten vor Gebrauch); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3 × 5 Minuten Spülen der Schnitte durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>, Entnahme aus den Coverplates<sup>™</sup>
- 8) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (s. oben) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 9) Waschen der Schnitte 3 × für je 5 Minuten in TBS und 1 × für 5 Minuten in Aqua dest.
- 10) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für etwa 10 Sekunden; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 11) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 12) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)



### 3.2.5 Nachweis von Zytokeratin

Der Nachweis von Zytokeratin erfolgte mittels eines kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpers gegen ein Zytokeratin-assoziiertes Protein. Es wurde die PAP-Methode angewandt (Sternberger et al., 1970).

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 10 Minuten; Entfernung des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2 × Isopropylalkohol, 1 × 96 % Alkohol für je 3 Minuten)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,5 % frisch zugesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a.; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 30 Minuten
- 3) Waschen der Schnitte mit TBS (s. Anhang)
- 4) Protease-Behandlung: Spülen der Schnitte in PBS (pH 7,2; s. Anhang) bei 37 °C für etwa 5 Minuten; Inkubation in 0,05 % bakterieller Protease Typ XXIV in PBS (pH 7,2) bei 37 °C für 5 Minuten; 3 × Waschen in eiskaltem TBS für je 5 Minuten
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates<sup>™</sup> (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates<sup>™</sup> in die Halterung
- 6) Inkubation mit 10 % Rattenserum in TBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 7) Auftragen des Primärantikörpers Maus anti-Zytokeratin-Pan (1:20 in TBS) oder des Kontrollantikörpers T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) in der gleichen Verdünnung (Negativkontrollschnitte); Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>
- 8) Auftragen des Sekundärantikörpers Ratte anti-Maus IgG (1:100 in TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>
- 9) Auftragen des Maus-PAP (1:500 in TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>, Entnahme aus den Coverplates<sup>™</sup>
- 10) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. oben) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 11) Waschen der Schnitte 3 × für je 5 Minuten in TBS und 1 × für 5 Minuten in Aqua dest.

- 12) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für etwa 10 Sekunden; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 13) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 14) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

### 3.2.6 Nachweis von MHC II

Der Nachweis von MHC II erfolgte mittels eines kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpers gegen die  $\alpha$ -Kette des humanen HLA-DR. Es wurde die PAP-Methode angewandt (Sternberger et al., 1970).

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup>; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 10 Minuten; Entfernung des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2  $\times$  Isopropylalkohol, 1  $\times$  96 % Alkohol, 1  $\times$  80 % Alkohol für je 3 Minuten)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,5 % frisch zugesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a.; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 30 Minuten
- 3) Waschen der Schnitte mit TBS (s. Anhang)
- 4) Zitratpuffer-Behandlung: Erhitzen von 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0, s. Anhang) in Plastikkuvetten im Wasserbad (Typ 1013; Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GfL), Burgwedel) auf 97 °C; Inkubation der Schnitte in den Küvetten bei 97 °C für 20 Minuten; anschließendes Abkühlen der Schnitte in den Küvetten außerhalb des Wasserbades für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates<sup>™</sup> (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates<sup>™</sup> in die Halterung
- 6) Inkubation mit 10 % Rattenserum in TBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 7) Auftragen des Primärantikörpers Maus anti-human HLA-DR (1:25 in TBS) oder des Kontrollantikörpers T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-T-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) in der gleichen Verdünnung (Negativkontrollschnitte);
- 8) Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C; 3  $\times$  Spülen der Schnitte für je 5 Minuten durch Einbringen von je. 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>
- 9) Auftragen des Sekundärantikörpers Ratte anti-Maus IgG (1:100 in TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate<sup>™</sup>

- 10) Auftragen des Maus-PAP (1:500 in TBS); Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur; 3 × Spülen der Schnitte für je 5 Minuten durch Einbringen von je 2 ml TBS in das Coverplate<sup>TM</sup>, Entnahme aus den Coverplates<sup>TM</sup>
- 11) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. oben) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- 12) Waschen der Schnitte 3 × für je 5 Minuten in TBS und 1 × für 5 Minuten in Aqua dest.
- 13) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für etwa 10 Sekunden; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 14) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 15) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

### 3.2.7 Immunhistologische Kontrollen

Alle Kontrollgewebe entstammten dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Als Positivkontrolle für FeLV dienten Milz, Knochenmark und Lymphknoten einer immunhistologisch positiv auf FeLV getesteten Sektionskatze. Für Vimentin wurde ein bereits diagnostiziertes Fibrosakom von Hund oder Katze als Positivkontrolle verwendet. Glatte und quergestreifte Muskulatur von Hund oder Katze dienten als Positivkontrolle für Desmin. Unveränderte Epidermis von Hund oder Katze wurde als Positivkontrolle für Zytokeratin genutzt. Für den Nachweis von MHC II wurde Milzgewebe einer Katze als Positivkontrolle herangezogen. Als Positivkontrolle für den Nachweis von  $\alpha$ -SMA dienten Uterus und Darm einer Katze.

### 3.2.8 Auswertung der Immunhistologie/Immunzytologie

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune granuläre zytoplasmatische Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollschnitt nicht nachweisbar waren. Beim Nachweis von FeLV-, Vimentin-, Zytokeratin- und Desmin-Antigen wurden die Tumoren und Zelllinien als positiv (fast alle Zellen positiv) oder negativ (keine Zellen positiv) eingestuft. Beim Nachweis von MHC II- und  $\alpha$ -SMA-Antigen wurde der Anteil der positiven Tumorzellen geschätzt und in Prozent der Tumorzellen angegeben. Dabei sind mit

der Bezeichnung „Tumorzellen“ alle Zellen innerhalb des Tumors mit Ausnahme eventuell vorhandener mononukleärer Entzündungszellen gemeint.

Für die Farbreaktion bei der Immunzytologie von L1-L5 und Kontrollzellen galten die gleichen Grundsätze wie bei den Tumoren. Der Anteil der MHC II- und  $\alpha$ -SMA-Antigen-positiven Zellen wurde geschätzt und in Prozent angegeben.

### 3.3 Enzymhistochemie/Enzymzytochemie

#### 3.3.1 Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Zum Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) wurde das Kit der Firma Sigma Diagnostics<sup>®</sup> verwendet. Der Nachweis der TRAP-Aktivität erfolgt entsprechend der Azofarbstoff-Kupplungsmethode (Barka und Anderson, 1962; Kipar, 1994, 2002) durch enzymatische Hydrolyse von Naphthol-AS-BI-Phosphat und anschließender Kupplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz. Es wurde das von Bleier (2003) abgewandelte Färbeprotokoll verwendet:

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol<sup>®</sup> ; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 15 Minuten
- 2) 10 Minuten Aceton
- 3) 10 Minuten 50 % Aceton (mit TBS, s. Anhang)
- 4) 10 Minuten waschen mit TBS
- 5) 3 Minuten waschen in Aqua dest.
- 6) In 2 Eppendorfgefäßen je 0,5 ml „Fast Garnet Solution“ (Fast Garnet GBC Base, 7,0 mg/ml, in 0,4 mol/l Salzsäure mit Stabilisator) und 0,5 ml Natriumnitritlösung (Sodium Nitrite, 0,1 mol/l) geben, 30 Sekunden vorsichtig schütteln und anschließend 2 Minuten stehen lassen.
- 7) In zwei 100 ml-Bechern folgendes ansetzen:

	<b>Becher A</b>	<b>Becher B</b>
37 °C warmes Aqua bidest.	45 ml	45 ml
Gemisch aus Schritt 5)	1,0 ml	1,0 ml
“Naphthol AS-BI-Phosphate Solution”*	0,5 ml	0,5 ml
“Acetate Solution”***	2,0 ml	2,0 ml
“Tartrate Solution”****	----	1,0 ml
* Naphthol AS-BI Phosphorsäure, 12,5 mg/ml aus Kit ** Acetatpuffer, 2,5 mol/l, pH 5,2 aus Kit *** L (+) Tartratpuffer, 0,335 mol/l, pH 4,9 aus Kit		

- 8) Schnitte für 1 h bei 37 °C lichtgeschützt in Bechern A und B inkubieren. Becher A dient für die Kontrollschnitte
- 9) Waschen der Schnitte in Aqua dest.
- 10) Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxin (Papanicolaou 1b; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.) für 2 Minuten; Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 5 Minuten
- 11) Waschen der Schnitte für 1 Minute in Aqua dest.
- 12) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaliges Klären in Roti-Histol<sup>®</sup>; Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (TissueTec<sup>®</sup>, Mod. 4765, Vogel Wilhelm GmbH, Gießen)

### 3.3.2 Enzymhistochemische Kontrolle

Als Positivkontrolle für die Enzymhistochemie diente ein felines VAS mit Riesenzellen, das mit dieser Methode bereits positiv getestet worden war (Bleier, 2003).

### 3.3.3 Auswertung der Enzymhistochemie/Enzymzytochemie

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell bis dunkelviolette, intrazytoplasmatische Reaktionsprodukte gewertet. Der Anteil der positiven Tumorzellen, gleichgültig ob ein- oder mehrkernig, wurde geschätzt und in Prozent angegeben. Dabei sind mit der Bezeichnung „Tumorzellen“ alle Zellen innerhalb des Tumors mit Ausnahme eventuell vorhandener mononukleärer Entzündungszellen gemeint.

Für die Farbreaktion bei der Enzymzytochemie von L1-L5 galten die gleichen Grundsätze wie bei den Tumoren. Der Anteil der positiven Zellen wurde geschätzt und in Prozent angegeben.

## 3.4 Chromosomenanalyse

### 3.4.1 Vorbereitung der Kulturen

Für die Chromosomenanalyse wurden je 3 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen einer Linie bzw. Kontrollkultur verwendet, die je 5 ml Medium enthielten und bei denen der Boden etwa zur Hälfte mit Zellen bewachsen war. Die Untersuchung erfolgte bei L1 in P82, bei L2 in P74, bei L3 in P48, bei L4 in P42, bei L5 in P36 und bei den Kontrollzellen in P1. Am Abend vor der Chromosomenpräparation wurden in jede Flasche 50 µl Colchizin-Lösung (Colcemid, 10 µg/ml in PBS, Biochrom AG, Berlin) gegeben. Anschließend wurden die Flaschen unter Normalbedingungen (vgl. 3.1.2.2) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die in der Mitose

arretierten Zellen durch mehrmaliges kräftiges Aufklopfen der Kulturflaschen auf einen dicken Katalog vom Flaschenboden abgelöst.

### 3.4.2 Chromosomenpräparation

- 1) Überführen der Überstände der 3 Flaschen mit den abgeklopften Zellen in ein konisches Plastikzentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss (BD Falcon<sup>TM</sup> 15 ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich)
- 2) Zentrifugation bei  $225 \times g$  für 10 Minuten
- 3) Absaugen des Überstandes bis auf einen Rest von ca. 1 ml, vorsichtiges Resuspendieren der Zellen
- 4) Zugabe von 8 ml hypotoner KCl-Lösung (0,075 M, s. Anhang, im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt), Mischen mit der Zellsuspension, Inkubation im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  für 10 Minuten
- 5) Zentrifugation bei  $225 \times g$  für 10 Minuten
- 6) Absaugen des Überstandes bis auf einen Rest von ca. 1 ml, Resuspendieren der Zellen
- 7) Zugabe von einigen Tropfen Fixator (Essigsäure-Methanol 1:3, s. Anhang, vorgekühlt auf  $-20^\circ\text{C}$ ), sofortiges kräftiges Mischen, dann weitere Zugabe von ca. 11 ml Fixator, kräftiges Mischen, Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten; Zentrifugation bei  $225 \times g$  für 10 Minuten
- 8) Absaugen des Überstandes bis auf einen Rest von ca. 1 ml, Resuspendieren der Zellen
- 9) Zugabe von 11 ml Fixator, kräftiges Mischen, Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten, Zentrifugation bei  $225 \times g$  für 10 Minuten
- 10) Absaugen des Überstandes bis auf einen Rest von ca. 1 ml, Resuspendieren der Zellen Schritte 9) und 10) zweimal wiederholen, beim letzten Absaugen so wenig Flüssigkeit wie möglich zurücklassen
- 11) Auftropfen auf Starfrost<sup>®</sup> Objektträger (vorgekühlt bei  $-20^\circ\text{C}$ ) aus einer Höhe von 20 bis 40 cm; Bildung von granulatartiger Oberfläche abwarten, ca. 4 Sekunden über heißem Wasserdampf schwenken, dann 1 Tropfen Essigsäure 100 % (Merck KGaA, Darmstadt) zugeben, dann erneut 4 Sekunden über heißem Wasserdampf schwenken; stehend trocknen lassen
- 12) Färben der Präparate nach Giemsa: 4 Minuten in Färbelösung (s. Anhang), gut wässern mit Aqua dest., 5 Minuten trocknen, 20 Minuten Xylol
- 13) Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup>

### 3.4.3 Auswertung der Chromosomenanalyse

Zur Analyse wurden solche Zellen ausgewertet, deren Chromosomen so dicht beieinander lagen, dass davon ausgegangen werden konnte, dass sie aus einer Zelle stammten, jedoch nicht übereinander lagen. Entsprechende Chromosomenansammlungen wurden fotografiert (Nikon Coolpix 4500 mit Mikroskopadapter LM-Scope, Österreich, am Mikroskop Orthoplan, Leica, Bensheim) und gezählt. Die Ergebnisse wurden in Box-Whisker-Plots graphisch dargestellt.

## 3.5 Untersuchung auf FeLV mit PCR

Um den Einbau von FeL-Provirus nachzuweisen oder auszuschließen, wurde eine PCR mit DNS aus allen Proben von Tumoren, Zelllinien und Kontrollen durchgeführt. Die entsprechende PCR weist einen DNS-Abschnitt aus dem U3-LTR Bereich des proviralen Genoms nach und wurde von Dr. Michael Suntz am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen etabliert (Suntz, 2007). Zum Nachweis, dass von jeder Probe amplifizierbare DNS vorhanden war, wurde jeweils im selben Lauf ein Ansatz mit Primern für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Als Kontrolle wurde DNS einer Katze verwendet, die bereits immunhistologisch und mit PCR positiv auf FeLV getestet worden war (freundlicherweise überlassen von Dr. Michael Suntz).

### 3.5.1 DNS-Extraktion aus Gewebe

Zur DNS-Extraktion wurde das PURGENE™ DNA Purification Kit (Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet.

- 1) Entnahme des Reaktionsgefäßes mit 10 mg Gewebe aus dem Gefrierschrank und sofortige Zugabe von 300 µl „Cell Lysis Solution“; mehrmaliges Invertieren
- 2) Zugabe von 1,5 µl „Proteinase K Solution“ (20 mg/ml), mehrmaliges Invertieren; Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
- 3) Zugabe von 1,5 µl „RNase Solution“, 25 Mal Invertieren; Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten; Abkühlen auf Raumtemperatur
- 4) Zugabe von 100 µl „Protein Precipitation Solution“ zu dem Zelllysatz; Vortexen bei hoher Geschwindigkeit für 20 Sekunden; Zentrifugieren für 3 Minuten bei 16.000 × g
- 5) Überführen des Überstandes in ein neues, mit 300 µl 100 % Isopropanol gefülltes 1,6 ml Reaktionsgefäß; 50 Mal invertieren; Zentrifugieren für 1 Minute bei 16.000 × g; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes

- 6) Zugabe von 300 µl 70 % Ethanol; Waschen des Pellets durch vorsichtiges Invertieren; Zentrifugieren für 1 Minute bei  $16.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes; Trocknen des DNS-Pellets im umgedrehten Mikrozentrifugengefäß auf Papier für 10 Minuten
- 7) Zugabe von 50 µl „DNA Hydration Solution“; Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur; Aufbewahren der DNS bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung

### 3.5.2 DNS-Extraktion aus kultivierten Zellen

Zur DNS-Extraktion wurde das PURGENE™ DNA Purification Kit (Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet.

- 1) Absaugen des Mediums einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit dichtem Zellrasen und Zugabe von 1,5 ml „Cell Lysis Solution“; Verteilen durch Schwenken der Flasche; mehrmaliges Auf- und Abpipettieren; Überführen in ein 12 ml Röhrchen
- 2) Zugabe von 7,5 µl „RNase Solution“, 25 Mal invertieren; Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten; Abkühlen auf Raumtemperatur
- 3) Zugabe von 500 µl „Protein Precipitation Solution“ zu dem Zelllysate; Vortexen bei hoher Geschwindigkeit für 20 Sekunden; Zentrifugieren für 10 Minuten bei  $2.000 \times g$
- 4) Überführen des Überstandes in ein neues, mit 1,5 ml 100 % Isopropanol versehenes 2 ml Reaktionsgefäß; 50 Mal Invertieren; Zentrifugieren für 3 Minuten bei  $2.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes
- 5) Zugabe von 1,5 ml 70 % Ethanol; Waschen des Pellets durch vorsichtiges Invertieren; Zentrifugieren für 1 Minute bei  $2.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes; Trocknen des DNS-Pellets im umgedrehten Mikrozentrifugengefäß auf Papier für 10 Minuten
- 6) Zugabe von 200 µl „DNA Hydration Solution“; Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur; Aufbewahren der DNS bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung

### 3.5.3 Durchführung der PCR

Folgende Primer wurden verwendet:

U3-LTR:

forward      5' - TTACTCAAGTATGTTCCCATG - 3'

reverse      5' - AGGTCTGAAGTCTGGTCAACT - 3'



feline GAPDH:

forward 5' - CAAATTCCACGGCACAGTCA - 3'

reverse 5' - TGTGGTCATGAGTCCCTCCA - 3'

**Tabelle 3.4: PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge	Hersteller
10 × Reaktionspuffer	2,5 µl	1 ×	NatuTec GmbH
DEPC-H <sub>2</sub> O	17,875 µl		
dNTP-Mix Gebrauchslösung (je dNTP 10 mM)	0,5 µl	dATP:dTTP:dGTP:dCTP (1:1:1:1), je 0,2 mM	Peqlab Biotechnologie GmbH
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol/µl	MWG Biotech AG
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol/µl	MWG Biotech AG
Taq-DNS-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl	0,625 U/Ansatz	NatuTec GmbH
DNS-Probe	2 µl		

Die PCR wurde im Multicycler PTC-200 (MJ Research, Inc., USA) durchgeführt.

### ***PCR-Ablauf***

- 1) 2 Minuten bei 94°C
- 2) 30 Zyklen: 60 Sekunden bei 92 °C  
30 Sekunden bei 53 °C  
30 Sekunden bei 72 °C
- 3) 2 Minuten bei 72 °C
- 4) 4 °C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

### **3.5.4 Detektion des PCR-Produkts mittels Elektrophorese**

Die Darstellung des PCR-Produkts erfolgte nach Auftrennung in einem 2 %igen Ethidiumbromid enthaltendem Agarosegel (s. Anhang) in 1 x TBE - Puffer (Trisborat-EDTA; s. Anhang). Vor dem Befüllen der Taschen wurde das erstarrte Agarosegel in die Elektrophoresekammer („Midi“, horizontal; Keutz, Reiskirchen) eingebracht und mit 1 × TBE-Puffer

ca. 0,5 cm überschichtet. Nach Ablauf der gesamten PCR-Zyklen erfolgte eine Mischung von 15 µl pro PCR-Ansatz mit je 4 µl eines Xylencyanol-Ladepuffers und das Einfüllen dieser Mischung in die dafür vorgesehenen Taschen im Gel. Als Ladepuffer diente eine mit dem Farbstoff Xylencyanol (Carl Roth, Karlsruhe; 2,5 mg/ml) versetzte, 15 %ige Ficoll® 400-Lösung (Serva, Heidelberg). Als DNS-Größenstandard wurde mit dem Enzym MSP I geschnittene pUC19-Plasmid DNS aufgebracht (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Mittels eines elektrischen Spannungsgebers (Consort, Belgien) wurde eine Spannung von 120 V für 30 Minuten angelegt. Es folgte die Dokumentation des Ergebnisses nach Sichtbarmachung der Banden durch UV-Transillumination (254 nm) (Vilber Lourmat, Torcy, FR) und Digitalfotografie mit dem Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (EastmanKodak Company, USA).

Die Gelanalyse erfolgte mit der Software 1D Image Analysis Software Windows Version 3.0 (Kodak Digital Science™, Eastman Kodak Company, USA). Als positiv wurden Proben mit einer Bande bei ca. 190 bp (U3-LTR) bzw. ca. 369 bp (GAPDH) im Vergleich mit dem pUC19/MSP I-Größenstandard und auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle gewertet.

### **3.5.5 Kontrollen für die PCR**

Als Negativkontrolle diente aus nicht FeLV-infizierten feline Embryozellen (FE-Zellen) gewonnene DNS (freundlicherweise überlassen von Dr. Michael Suntz, Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen). Als positive Kontrollprobe diente DNS (ebenfalls freundlicherweise überlassen von Dr. Michael Suntz), gewonnen aus der permanenten, in Suspensionskultur wachsenden lymphomatösen Lymphoblasten-Zelllinie FL74-UCD-1 (freundlicherweise überlassen von Herrn Gordon Theilen, University of California, Davis, USA). Diese Zelllinie war aus einem Lymphosarkom der Niere einer FeLV-inokulierten Katze etabliert worden und ist persistent mit dem FeLV-Stamm KT-FeLV-UCD-1 infiziert (Theilen et al., 1969). Als Nullprobe diente DEPC-Wasser.

## **3.6 Ermittlung einer Teilsequenz für feline FGF-2**

Um die Tumoren und Zelllinien auf die Transkription von FGF-2 untersuchen zu können, wurde zunächst eine - zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlichte - Teilsequenz der cDNS für feline FGF-2 benötigt. Diese wurde durch Klonierung und Sequenzierung eines PCR-Produkts mit selbst entwickelten Primern ermittelt. Als Probe diente cDNS von feline Feten mit einer Scheitel-Steiss-Länge von ein bis drei Zentimetern, die bei routinemäßig im Besitzerauftrag durchgeführten Kastrationen von tragenden Katzen in der Klinik für

Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelt worden waren. Es handelte sich um Katzen von Tierschutzvereinen, deren Rasse und Alter nicht bekannt waren.

### 3.6.1 Vorbereitung der Proben

Der Uterus mit den Feten wurde direkt nach der Entnahme in einem Gefrierbeutel verpackt und in einer Styroporkiste mit bei -20 °C vorgekühlten Akkus in das Institut für Veterinär-Pathologie verbracht. Anschließend wurden die Feten mit steriler Pinzette und Skalpellklinge aus dem Uterus entfernt, einzeln in Aluminiumfolie gewickelt, in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur RNS-Isolierung wurden insgesamt je 30 mg Gewebe als 20 µm dicke Schnitte in einem 2 ml-Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert.

### 3.6.2 RNS-Extraktion

Zur RNS-Extraktion wurde das RNEasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

- 1) Entnahme des Mikrozentrifugengefäßes mit 30 mg Gewebe aus dem Gefrierschrank und sofortige Zugabe von 600 µl „RLT-Puffer“ mit 1 % β-Mercaptoethanol (Fluka-Finchemikalien GmbH, Neu-Ulm)
- 2) Homogenisieren des Gewebes im „RLT-Puffer“ mit 2 ml Spritze und Kanüle
- 3) Zugabe des gleichen Volumens (600 µl) 70 % Ethanol zur Probe; Vermischen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (nicht zentrifugieren)
- 4) Überführen von 700 µl der Probe einschließlich jeglichen entstandenen Präzipitats in eine „RNEasy mini spin column“, die in ein 2 ml-Sammelgefäß eingesetzt wurde; Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 8.000 × g; Entleeren des Sammelgefäßes
- 5) Überführen des verbliebenen Rests der Probe einschließlich jeglichen entstandenen Präzipitats in die „RNEasy mini spin column“; Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 8.000 × g; Entleeren des Sammelgefäßes
- 6) Zugabe von 700 µl Puffer „RW1“ in die „RNEasy mini spin column“; Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 8.000 × g (Waschschritt); Verwerfen des Sammelgefäßes mit Inhalt
- 7) Überführen der „RNEasy mini spin column“ in ein neues 2 ml-Sammelgefäß; Zugabe von 500 µl Puffer „RPE“ (Vorbereitung des Puffer RPE: Zugabe von 4 Volumen Ethanol (96-100 %) in das im Kit enthaltene RPE-Puffer-Gefäß) in die „RNEasy mini

spin column“; Zentrifugieren für 15 Sekunden bei  $8.000 \times g$  (Waschschritt); Entleeren des Sammelgefäßes

- 8) Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Puffer „RPE“ in die „RNEasy mini spin column“; Zentrifugieren für zwei Minuten bei höchster Geschwindigkeit ( $15.000 \times g$ )
- 9) Überführen der „RNEasy mini spin column“ in ein neues 1,5 ml-Sammelgefäß; Zentrifugieren für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit ( $15.000 \times g$ ) (Vollständige Entfernung des Puffers „RPE“)
- 10) Überführen der „RNEasy mini spin column“ in ein neues 1,5 ml-Sammelgefäß; 32  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser direkt auf die „RNEasy mini spin column“ pipettieren; Zentrifugieren für eine Minute bei  $8.000 \times g$  (Eluierungsschritt)
- 11) Lagerung der RNS bis zur Weiterverarbeitung bei  $-70^\circ\text{C}$

### 3.6.3 DNase-Behandlung

#### *DNase-Ansatz*

Tabelle 3.5: DNase-Ansatz

Komponente	Menge	Endkonzentration	Hersteller [Bestellnummer]
10 $\times$ „RQ1-DNase-Buffer“	1,0 $\mu\text{l}$		Promega [M6101]
„RQ1-Dnase“ (1 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$	1 U/Ansatz	Promega [M610A]
„RNasin“ (Ribonuclease Inhibitor; 40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,25 $\mu\text{l}$	10 U/Ansatz	Promega [N251A]
RNS-Extrakt	7,75 $\mu\text{l}$		

Inkubation für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$

Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  „RQ1-DNase Stop Solution“ (20 mM EDTA (pH 8); Promega)

Inkubation für 5 Minuten bei  $75^\circ\text{C}$ ; Kühlung bei  $4^\circ\text{C}$  bis zur direkt im Anschluss durchgeführten RT-Reaktion

### 3.6.4 RT-Reaktion

#### *RT-Ansatz*

Die Bestandteile wurden in der Reihenfolge pipettiert, in der sie in der Tabelle aufgelistet sind. Die Herstellung des Ansatzes erfolgte auf Eis.

**Tabelle 3.6: RT-Ansatz**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration/ Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller [Bestell-Nummer]</b>
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,0 µl	5 mM	Promega [A3511]
10 × „RT-Puffer“	2,0 µl		Promega [A3561]
dNTP (je 100 mM)	2,0 µl	dATP; dCTP; dGTP; dTTP- Mix (1:1:1:1; je 10 mM)	Promega [U1330]
„RNAsin“ (Ribonuclease- Inhibitor; 40 U/µl)	0,25 µl	10 U/Ansatz	Promega [N251A]
„Random Hexamers“ (1,5 mM)	1,0 µl	75 µM	Promega [C1181]
AMV-Reverse Transcriptase (10 U/µl)	0,4 µl	4 U/Ansatz	Promega [M5108]
RNS-Probe nach DNase- Behandlung	10,35 µl		

10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur

50 Minuten Inkubation bei 42 °C

5 Minuten Inkubation bei 95 °C

Zugabe von 80 µl DEPC-Wasser (s. Anhang)

Lagerung der cDNS bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C

### **3.6.5 Entwicklung der Primer**

Zur Entwicklung der Primer wurden die vom National Institute for Biotechnology Information (NCBI) im Internet veröffentlichten cDNS-Sequenzen für FGF-2 von Mensch (Accession Number NM\_002006 NCBI) und Maus (Accession Number NM\_008006 NCBI) mittels des Programms BLASTSearch (Basic Local Alignment Search Tool) (megablast; NCBI, USA) auf Homologien untersucht.

Mit Hilfe des im Internet frei zugänglichen Programms GeneFisher wurden für homologe Bereiche folgende Primer ausgewählt:

forward                    5'-CCACTTCAAGGACCCCAA-3'

reverse                    5'-GTTCGTTTCAGTGCCACA-3'

Die Primer liegen in zwei benachbarten Exons der humanen Sequenz (Accession Number NM\_002006 NCBI) an Position 417 (forward) und 717 (reverse). Die erwartete Länge des PCR-Produkts betrug damit ca. 300 bp. Als Probe wurde cDNS aus feline Feten verwendet, deren Gewinnung unter 3.6.1-3.6.4 beschrieben ist.

### 3.6.6 PCR-Ansatz

**Tabelle 3.7: PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge	Hersteller
10 × Reaktionspuffer	5 µl	1 ×	NatuTec GmbH
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 µl	1 mM	Promega [A3511]
dNTP-Mix (je 100 mM)	4 µl	dATP; dCTP; dGTP; dTTP-Mix (1:1:1:1; je 8 mM)	Peqlab Biotechnologie GmbH
Taq-DNS-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U/Ansatz	NatuTec GmbH
DEPC-Wasser	30,7 µl		
Primer-Mix (je 20 pmol/µl)	4 µl	Je 1,6 pmol/µl	MWG Biotech GmbH
cDNS-Probe	4 µl		

Die PCR wurde im Multicycler PTC-200 (MJ Research, Inc., USA) durchgeführt.

### 3.6.7 PCR-Ablauf

2 Minuten bei 94 °C

40 Zyklen: 30 Sekunden bei 94 °C

45 Sekunden bei 53 °C

30 Sekunden bei 72 °C

5 Minuten bei 72 °C

4 °C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

### 3.6.8 Detektion des PCR-Produkts mittels Elektrophorese

Das PCR-Produkt wurde mittels Elektrophorese in einem Gel mit 2 % Agarose und Ethidiumbromid (s. Anhang) dargestellt. Es wurden 30 µl PCR-Produkt mit 6 µl Ladepuffer

mit Xylenzanol (s. Anhang) in  $1 \times$  TBE (s. Anhang) bei 120 Volt und 50 mA für 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente pUC 19/Msp I (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe). Die Visualisierung fand durch UV-Transillumination bei 312 nm statt.

### **3.6.9 Klonierung des PCR-Produkts**

Die Klonierung erfolgte mit dem Qiagen<sup>®</sup> PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden) und dem Escherichia coli-Stamm Qiagen EZ-Kompetente<sup>®</sup> Zellen (Qiagen, Hilden). Als Vektor für die Klonierung wurde dabei das Plasmid pDrive (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

#### **3.6.9.1 Präparation der Insert-DNS für die Klonierung**

Die Insert-DNS für die Klonierung wurde aus dem Agarosegel mittels des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren) folgendermaßen gewonnen:

- 1) Ausschneiden des Gelstücks mit dem gewünschten DNS-Fragment mittels einer sauberen Skalpellklinge; Überführen des Gelstücks in ein zuvor gewogenes 1,6 ml Reaktionsgefäß; erneutes Wiegen und Ermittlung des Gewichts des Gelstücks
- 2) Zugabe von je 300 µl Puffer „NT1“ je 100 mg Agarosegel; Inkubation für 5-10 Minuten bei 50 °C (bis zur vollständigen Auflösung des Gelstücks); Mischen (Vortexen) für 2 Minuten
- 3) Einsetzen einer „NucleoSpin Extrakt Column“ in ein 2 ml Sammelröhrchen und Beladen mit der Probe; Zentrifugieren für 1 Minute bei  $8.000 \times g$ ; Entleeren des Sammelröhrchens
- 4) Zugabe von 600 µl Puffer „NT3“; Zentrifugieren für 1 Minute bei  $11.000 \times g$ ; Entleeren des Sammelröhrchens
- 5) Zugabe von 200 µl Puffer „NT3“; Zentrifugieren für 2 Minuten bei  $11.000 \times g$ ; Überführen der „Nucleospin Extrakt Column“ in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß; Zugabe von 50 µl Elutionspuffer „NE“; Inkubation für 1 Minute bei Raumtemperatur; Zentrifugieren für 1 Minute bei höchster Geschwindigkeit ( $15.800 \times g$ ); Lagerung des Reaktionsgefäßes bei -20 °C bis zu Weiterverarbeitung

### **3.6.9.2 Herstellung von LB (Luria-Bertani)-Medium**

Für 1 l Medium 10 g Pepton (Serva, Böhringer Ingelheim, Bioprodukt Partnership, Heidelberg), 5 g Hefeextrakt (Serva) und 10 g NaCl in 800 ml Aqua dest. auflösen; die Lösung mit 5 % HCl auf den pH-Wert 7,0 einstellen; Auffüllen mit Aqua dest. auf 1 l; Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C; Lösung bei Raumtemperatur auf 55 °C abkühlen lassen; Zugabe von 80 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen); Lagerung bei 4 °C

### **3.6.9.3 Herstellung von LB-Platten**

LB-Medium herstellen (s. oben), jedoch vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (DIFCO-Laboratories, Detroit, USA) zugeben; Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C; Lösung bei Raumtemperatur auf 55 °C abkühlen lassen; Zugabe von 80 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen); Giessen von ca. 10 mm dicken Platten und Auskühlen lassen; Lagerung bei 4 °C

### **3.6.9.4 Herstellung der X-Gal Stammlösung (40 mg/ml)**

40 mg X-Gal (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) in 1 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auflösen; Lagerung vor Licht geschützt bei -20 °C

### **3.6.9.5 Vorbereitung der Transformation**

- 1) Wasserbad auf 42 °C erwärmen
- 2) SOC-Medium aus dem Kit (s. oben) auf Raumtemperatur bringen
- 3) LB-Agarplatten für 30 Minuten bei 37 °C erwärmen
- 4) je 40 µl IPTG Stammlösung (23mg/ml, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) auf vorgewärmte LB-Platten pipettieren und ausspateln; Trocknen bei Raumtemperatur
- 5) je 40 µl X-Gal Stammlösung auf bei 37 °C (Brutschrank) vorgewärmte LB-Platten pipettieren und ausspateln; Trocknen bei Raumtemperatur für 15 Minuten; Platten lichtgeschützt bei 37 °C bis zur Verwendung lagern
- 6) ein Röhrchen des Escherichia coli-Stamms Qiagen EZ-Kompetente<sup>®</sup> Zellen (Qiagen, Hilden) auf Eis auftauen



### 3.6.9.6 Ligation

**Tabelle 3.8: Herstellung des Reaktionsansatzes auf Eis**

Reagenz	Volumen
pDrive Vektor (Kit, s. oben)	1 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1 µl
Steriles Wasser (Kit, s. oben)	3 µl
Ligationsmix (Kit, s. oben)	5 µl

Reaktionsansatz vorsichtig mischen und für 30 Minuten bei 5 °C (Kühlschrank) inkubieren.

### 3.6.9.7 Durchführung der Transformation

- 1) 2 µl des Ligationsansatzes in ein Fläschchen Qiagen EZ-Kompetente<sup>®</sup> Zellen (Qiagen, Hilden) geben und vorsichtig mischen (nicht auf- und abpipettieren); Inkubation für 5 Minuten auf Eis
- 2) Inkubation der Zellen für 30 Sekunden bei 42 °C (Hitzeschock); sofortiges Überführen des Röhrchens auf Eis und Inkubation für 2 Minuten
- 3) Zugabe von 250 µl raumtemperiertem SOC-Medium
- 4) Ausplattieren von 20 µl, 40 µl, 60 µl und 80 µl Transformationsprodukt auf je 5 mit IPTG und X-Gal versehene (s. 3.6.9.5) LB-Platten und Antrocknen lassen; Inkubation über Nacht für 15-18 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank (GFL, Burgwedel)
- 5) Aufnehmen von 11 weissen Einzelkolonien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers und Überführen in einzelne 14 ml-Glasröhrchen mit Metalldeckel mit flüssigem LB-Medium mit 80 µg/ml Ampicillin; Kultivierung für 15-18 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank auf einem Schüttler.

### 3.6.9.8 Screening der selektierten Klone

Die Aufnahme des rekombinanten Vektors in die Klone wurde im Rahmen einer Screening-PCR untersucht. Dafür wurden zunächst von jeder Übernachtskultur 10 µl in einem speziell dafür bereitgestellten Thermocycler (Thermocycler 60/2, bio-med, Gesellschaft für Biotechnologie und Medizintechnik mbH, Deutschland) für 20 Minuten bei 95 °C inkubiert (Abtöten der Bakterien).

Folgende vektorspezifische Primer wurden verwendet:

forward	M13/pUC sequencing primer (-46) 5'- GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA - 3
reverse	M13/pUC reverse sequencing primer (-46) 5'- GAGCGGATAACAATTTACACAGG - 3

**Tabelle 3.9: Ansatz der PCR**

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
DEPC-Wasser	6,5 µl	
PCR-Puffer (incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	1,5 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,3 µl	0,5 mM
dNTP (je 10 mM)	0,6 µl	0,4 mM jeweils
Primer Mix (je 5 µM)	1,0 µl	je 0,3 µM
Taq-DNS-Polymerase (5 U/µl)	0,12 µl	0,6 U/Ansatz
Bakteriensuspension	5 µl	
Gesamtvolumen	15,02 µl	

Die PCR wurde im Multicycler PTC-200 (MJ Research, Inc., USA) durchgeführt.

Als Nullkontrolle diente DEPC-Wasser.

### 3.6.9.8.1 PCR-Ablauf

2,5 Minuten bei 94 °C

30 Zyklen: 15 Sekunden bei 92 °C

30 Sekunden bei 65 °C

60 Sekunden bei 72 °C

5 Minuten bei 72 °C

4 °C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

Das PCR-Produkt wurde mittels Elektrophorese in einem Gel mit 2 % Agarose und Ethidiumbromid (s. Anhang) wie unter 3.5.1 beschrieben, aber mit einer Laufzeit von 50 statt 30 Minuten, dargestellt. Für die Isolierung der Plasmid-DNS weiterverwendet wurden die Kolonien, bei denen ein PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 597 bp (297 bp als Größe des rezirkulierten Plasmids ohne DNS-Fragment plus ca. 300 bp als Größe des erwarteten FGF-2-DNS-Fragments) nachgewiesen werden konnte.

### 3.6.9.9 Isolierung der Plasmid-DNS

Die Isolierung erfolgte mit dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen).

- 1) Je 5 ml der Übernachtskultur durch Zentrifugieren für 10 Minuten bei  $5.000 \times g$  in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen pelletieren; Überstand abnehmen und verwerfen
- 2) 250 µl „Lösung I/RNase A“ zugeben und Bakterienpellet durch sorgfältiges Vortexen darin resuspendieren; umfüllen in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß

- 3) Zugabe von 250 µl „Lösung II“ und vier- bis sechsmaliges Invertieren, bis ein klares Lysat entsteht
- 4) Versetzen des klaren Lysats mit 350 µl „Lösung III“ und durch mehrmaliges Invertieren mischen, bis sich ein weisses, flockiges Präzipitat bildet; zentrifugieren für 5 Minuten bei  $10.000 \times g$
- 5) HiBind®-Miniprep-Zentrifugensäule in ein 2 ml Sammel-Tube stecken und klaren Überstand aus Schritt 4) vorsichtig einfüllen; zentrifugieren für 1 Minute bei  $10.000 \times g$ ; Säulendurchfluss verwerfen
- 6) Zugabe von 500 µl „HB-Puffer“; zentrifugieren für 1 Minute bei  $10.000 \times g$ ; Säulendurchfluss verwerfen
- 7) Zugabe von 750 µl des zuvor mit 100 % Ethanol komplettierten DNA-Waschpuffers; zentrifugieren für 1 Minute bei  $10.000 \times g$ ; Säulendurchfluss verwerfen; Schritt wiederholen; trocknen durch einminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit
- 8) Überführen der Zentrifugensäule in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen; Zugabe von 50 µl TE-Puffer; Zentrifugieren für 1 Minute bei  $10.000 \times g$ ; Lagerung des Reaktionsgefäßes bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zu Weiterverarbeitung

### **3.6.9.10 PCR zur Kontrolle der gewonnenen Plasmide**

Zur Bestätigung, dass das gesuchte Insert im Plasmid enthalten war, wurde die Plasmid-DNS als Probe in eine PCR mit den FGF-2-spezifischen Primern (s. 3.6.5) eingesetzt. Die PCR wurde wie unter 3.6.6-3.6.7 beschrieben, aber mit halber Menge durchgeführt. Als Probe dienten 2 µl der Plasmid-DNS (1:20 verdünnt aus eluierter Plasmid-DNS). Als Nullkontrolle wurde DEPC-Wasser verwendet. Die Detektion des PCR-Produkts erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben.

Die Plasmid-DNS mehrerer Klone, die nach obiger PCR eine Bande in gesuchter Größe (ca. 300 bp) ergab, wurde zum Sequenzieren zu MWG Biotech AG, Ebersberg geschickt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe plasmidspezifischer Primer.

### **3.7 Etablierung von TaqMan-Real-Time-PCR-Systemen zum Nachweis der Transkription von felinem EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2**

Da für felines EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2 noch keine TaqMan-Real Time-PCR-Systeme zur Verfügung standen, wurden solche im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

#### **3.7.1 Entwicklung der TaqMan-Primer und -Sonden**

Für die Zielgene feliner EGF, PDGF und TGFβ1 konnten die cDNS-Sequenzen als Grundlage der Primer- und Sondenentwicklung der NCBI (EGF: Acc. Nr. AB050947; PDGF: Acc. Nr. X05112; TGFβ1: Acc. Nr. AY425617) entnommen werden. Die cDNS-Sequenzen für EGF und TGFβ1 stammten von der Hauskatze (*felis catus*), die cDNS-Sequenz für PDGF dagegen von der Wildkatze (*felis sylvestris*). Eine cDNS-Teilsequenz für FGF-2 wurde, wie oben beschrieben (3.6), selbst ermittelt.

Mittels der Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Ludger Fink vom Institut für Pathologie des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Zielgene feliner EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2 je drei Oligonukleotidprimer gemäß den Empfehlungen des Herstellers ausgewählt (Livak et al., 1995): zwei Primer und ein intern liegendes Oligonukleotid als Sonde. Die Sonde wurde am 5'-Ende mit dem Reporter-Farbstoff FAM (6-Carboxyfluoreszein) und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) markiert. Zur Vermeidung eines Angriffs der DNA-Polymerase wurde die Sonde am 3'-Ende mit Phosphat geblockt. Um eine Primerextension innerhalb weniger Sekunden zu ermöglichen und um die Durchführung eines separaten Elongationsschritts unnötig werden zu lassen, wurden die Primer so gewählt, dass kurze PCR-Produkte mit einer Länge von ca. 100 bp entstehen. Die Sequenzen wurden so gewählt, dass Forward und Reverse Primer vermutlich in zwei aufeinanderfolgenden Exonen der entsprechenden Gene liegen, während die Sonde den Übergang zwischen den beiden Exons einschließt. Da für die Katze keine Genomsequenzen zur Verfügung standen, wurden zur Ermittlung der Exon-Exon-Übergänge die entsprechenden humanen Genomsequenzen (EGF: NCBI Acc. Nr. NT\_028147, PDGF: NCBI Acc. Nr. NT\_011520.8, TGFβ: NCBI Acc. Nr. NT\_011109.13, FGF-2: NCBI Acc. Nr. NT\_016354.12) herangezogen. Ausgesucht wurden Übergänge, an denen die Introns eine Länge von mindestens 1000 bp haben. Primer- und

Sondensequenzen sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Der vermutete Exon-Exon-Übergang ist unterstrichen.

**Tabelle 3.10: Primer und Sondersequenzen**

Zytokin/ Wachstums- faktor	Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Länge des PCR- Produkts
EGF	Primer forward	AATGTGGTTGCTTTCCTGGGTA	94 bp
	Primer reverse	TGAGAATTGGCAAACAGCAAAA	
	Sonde	TTGTGCAGCATCAG <u>G</u> ACCACAGCCATT	
PDGF	Primer forward	GAGACGGTGGTGGCTGCA	95 bp
	Primer reverse	GTCCGAATGGTCACCCGA	
	Sonde	CAAGAGCAGCGAG <u>G</u> ACACCCCAGAC	
TGFβ1	Primer forward	TGTCACAGGAACAGTGGGCA	102 bp
	Primer reverse	CGGAATGGCTGTCCTTTGAT	
	Sonde	CCCTCTACTTCC <u>C</u> CTCCATGGCTCAG	
FGF-2	Primer forward	GCTTCTTCCTGCGCATCCA	99 bp
	Primer reverse	CCCCTCTCTCTTCTGCCTGAA	
	Sonde	AGCGACCCTCACAT <u>C</u> AAACTGCAAC	

### 3.7.2 Testen der Primer

Zunächst wurden die Primer ohne Sonden getestet. Zur Überprüfung ihrer Spezifität wurden die entstandenen PCR-Produkte in einen Vektor ligiert, daraus sequenziert und mit den Ausgangssequenzen verglichen. In die PCR wurde cDNS aus feline Feten eingesetzt, deren Gewinnung unter 3.6.1-3.6.4 beschrieben ist. Die Primer wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt, wie in dem für feline GAPDH bereits etablierten System (Leutenegger et al., 1999). Statt der Sonden wurde ein gleiches Volumen RNase-freies Wasser eingesetzt.

**Tabelle 3.11: PCR-Ansatz**

<b>Komponenten</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration/ Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller [Bestellnummer]</b>
TaqMan Universal PCR-Mastermix	12,5 µl		Eurogentec [RT-QX-03]
Primer f [10 µM]	1,0 µl	400 nM	Eurogentec
Primer r [10 µM]	1,0 µl	400 nM	Eurogentec
Statt Sonde [10 µM]: RNase-freies Wasser	0,2 µl		Promega [P1193]
RNase-freies Wasser	5,3 µl		Promega [P1193]
cDNS	5,0 µl		

Die PCR wurde im ABI PRISM® Sequence Detection System 7700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

#### Real-Time-PCR-Protokoll

2 min bei 50 °C

10 min bei 95 °C

45 Zyklen : 15 sec bei 95 °C

60 sec bei 60 °C

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.5.4), um das Übereinstimmen der erwarteten und der tatsächlichen Länge des PCR-Produkts (ca. 100 bp, s. Tabelle 3.10) nachzuprüfen.

Die Ligation erfolgte jeweils nach dem unter 3.6.9.6 beschriebenen Protokoll.

Die Ligationsprodukte wurden in folgende PCR eingesetzt:

**Tabelle 3.12: PCR-Ansatz**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
DEPC H <sub>2</sub> O	80 µl
PCR-Puffer S	10 µl
dNTP	4 µl
Primer forward	2 µl
Primer reverse	2 µl
Taq-DNS-Polymerase	1 µl
Ligationsprodukt	1 µl

Als Primer wurden jeweils folgende Kombinationen verwendet:

Primer forward: vektorspezifischer „M13/pUC sequencing primer (-46)“ und

Primer reverse: der für den entsprechenden Wachstumsfaktor sequenzspezifische Primer oder:

Primer forward: der für den entsprechenden Wachstumsfaktor sequenzspezifische Primer und

Primer reverse: vektorspezifischer „M13/pUC sequencing primer (-46)“

PCR-Ablauf:

2,5 Minuten bei 94 °C

30 Zyklen: 15 Sekunden bei 92 °C

60 Sekunden bei 60 °C

30 Sekunden bei 72 °C

5 Minuten bei 72 °C

4 °C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese in einem Gel mit 2 % Agarose und Ethidiumbromid (s. Anhang) wie unter 3.5.4 beschrieben, aber mit einer Laufzeit von 40 Minuten, dargestellt.

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das NucleoSpin® Extract Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Protokoll für die Aufreinigung von PCR-Produkten, verwendet.

- 1) Zugabe von je 300 µl Puffer „NT2“ je 75 µl PCR-Produkt
- 2) Einsetzen einer „NucleoSpin Extract Column“ in ein 2 ml Sammelröhrchen und beladen mit der Probe; zentrifugieren für 1 Minute bei  $11.000 \times g$ ; entleeren des Sammelröhrchens
- 3) Zugabe von 600 µl Puffer „NT3“; zentrifugieren für 1 Minute bei  $11.000 \times g$ ; entleeren des Sammelröhrchens
- 4) Zugabe von 200 µl Puffer NT3; zentrifugieren für 2 Minuten bei  $11.000 \times g$ ; überführen der „Nucleospin Extract Column“ in ein sauberes 1,6 ml Reaktionsgefäß; Zugabe von 50 µl Elutionspuffer „NE“; Inkubation für 1 Minute bei Raumtemperatur; zentrifugieren für 1 Minute bei höchster Geschwindigkeit ( $15.800 \times g$ ); Lagerung des Reaktionsgefäßes bei -20 °C bis zu Weiterverarbeitung

Anschließend wurde der DNS-Gehalt der PCR-Produkte mittels Photometer (GeneQuant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) bestimmt, und es wurden je ca. 5 µg DNS zur Sequenzierung geschickt (MWG Biotech AG, Ebersberg).

### 3.7.3 Optimierung der Real-Time PCR

Zur Optimierung der Systeme wurde zunächst eine Verdünnungsreihe für die Primer (50 nM, 300 nM, 900 nM) bei einer Sondenkonzentration von 100 nM im Doppelansatz durchgeführt und die Kombination ausgewählt, die den niedrigsten  $C_T$ -Wert und den höchsten  $\Delta R_N$ -Wert (das stärkste Signal, das bei einem spezifischen Set von PCR-Bedingungen generiert wird), ergab. Anschließend wurde mit einer Verdünnungsreihe für die Sonde (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM) und der zuvor ermittelten optimalen Primerkonzentration im Doppelansatz die optimale Konzentration ermittelt, die den niedrigsten  $C_T$ -Wert ergab (User Bulletin: Sequence detection systems Quantitative Assay Design and Optimization; Applied Biosystems, Foster City, USA).

### 3.7.4 Bestimmung der Effizienzen der TaqMan-Real-Time-PCR-Systeme zum Nachweis der Transkription von feline EGF, PDGF, TGF $\beta$ 1 und FGF-2

Zur Bestimmung der Effizienzen der neu entwickelten TaqMan-Real-Time-PCR-Systeme für feline EGF, PDGF, TGF $\beta$ 1 und FGF-2 wurde eine cDNS-Verdünnungsreihe (1+1) über 5 Schritte hergestellt und im Dreifachansatz mit den zuvor ermittelten, optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen der Systeme eingesetzt. Von den gewonnenen  $C_T$ -Werten wurden zunächst die Mittelwerte berechnet und dann in Microsoft Excel die Steigung der zugehörigen Regressionsgeraden ermittelt. Anschließend wurde mit folgender Formel die Effizienz berechnet:  $\varepsilon = 10^{-1/m}$  mit  $m$  = Steigung der Regressionsgeraden (Wilhelm und Pingoud, 2003). Als Proben diente wieder cDNS von feline Feten für FGF-2, PDGF und TGF $\beta$ 1. Für EGF wurde cDNS aus einer Katzenmilz mit follikulärer Hyperplasie (Sektionsfall S 1448/04) benutzt, da die in der aus Feten gewonnenen cDNS gemessenen  $C_T$ -Werte für die Herstellung einer Verdünnungsreihe bei diesem Wachstumsfaktor zu hoch waren. Die Gewinnung der cDNS aus der Milz erfolgte aus bei -70 °C gelagertem, bereits geschnittenem Material (zur Verfügung gestellt von Herrn Alexander Weiss (Ph.D.), Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) wie unter 3.6.2-3.6.5 für die cDNS aus feline Feten beschrieben. Die cDNS, aus der die Verdünnungsreihe für die Effizienzbestimmung angefertigt wurde, wurde jedoch nicht direkt nach der RT-Reaktion mit DEPC-Wasser verdünnt. Um eine ausreichende Menge zu erhalten, wurden von jeder RNS-Probe mehrere Doppelansätze umgeschrieben und zusammengegeben.



### 3.8 TaqMan-Systeme für felines IL-1, felines TNF und feline GAPDH

Endsprechende Systeme sind bereits in der Literatur beschrieben (Kipar et al., 2001; Leutenegger et al., 1999) und wurden übernommen. Primer- und Sondensequenzen sind in Tabelle 3.13 aufgelistet, die Exon-Exon-Übergänge sind unterstrichen.

**Tabelle 3.13: Sequenzen der Primer und Sonden für die Real-Time PCR zum quantitativen Nachweis von feline IL-1, TNF und feline GAPDH**

<b>Zytokin / GAPDH</b>	<b>Oligonukleotid</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Länge des Amplifikats</b>
IL-1	Primer forward	AATGACCTGTTCTTTGAGGCTGAT	76 bp
	Primer reverse	CCAGAA <sup>AA</sup> ACTGTGGCTCAGGTT	
	Sonde	CGAA <sup>AA</sup> AAGATGAAG <sup>GG</sup> CAGCCTCCAA	
TNF	Primer forward	CTTCTCGAACTCCGAGTGACAAG	74 bp
	Primer reverse	CCACTGGAGTTGCCCTTCA	
	Sonde	TAGCCCATGTAGTAG <sup>CA</sup> AAACCCCGAAGC	
GAPDH	Primer forward	GCCGTGGAATTTGCCGT	82 bp
	Primer reverse	GCCATCAATGACCCCTTCAT	
	Sonde	CTCAACTACATGGTCTACATGTTCC <sup>AG</sup> TATGATTCCA	

### 3.9 Untersuchung von Tumoren und Zelllinien auf die Transkription von feline IL-1, TNF, EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2

Die Untersuchung auf die Transkription von feline IL-1, TNF, EGF, PDGF, TGFβ1 und FGF-2 erfolgte im Rahmen einer Real-Time-PCR mit einem Sequenz-spezifischen Primer-Sondensystem nach unspezifischer RT-Reaktion. Als „housekeeping“ Gen zur Kontrolle erfolgreicher cDNA-Synthese und Referenz für die Auswertung diente feline GAPDH.

Als Positivkontrollen dienten für IL-1 und TNF cDNS aus einer Katzenmilz mit follikulärer Hyperplasie (S 1448/04) und für EGF, PDGF, TGF $\beta$ 1, FGF-2 und GAPDH cDNS aus feline Feten. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser eingesetzt.

### 3.9.1 RNS-Extraktion aus Gewebe

Zur RNS-Extraktion wurde das Pureskript® RNS Isolierungs-Kit (Biozym, Oldendorf) verwendet.

- 1) Zugabe von 300  $\mu$ l „Cell Lysis Solution“ zu den vorbereiteten 10 mg Gewebe im 2 ml Reaktionsgefäß, das bis dahin auf Eis aufbewahrt wurde; zerkleinern des Gewebes durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausspritzen mittels steriler 2 ml-Spritze und Kanüle
- 2) Zugabe von 100  $\mu$ l „Protein Precipitation Solution“ zu dem Zelllysate; 10 Mal vorsichtig invertieren, anschließende Inkubation auf Eis für 5 Minuten; zentrifugieren für 3 Minuten bei  $16.000 \times g$
- 3) Überführen des Überstandes in ein neues, mit 300  $\mu$ l 100 % Isopropanol versehenes 1,6 ml Reaktionsgefäß; 50 Mal vorsichtig invertieren; zentrifugieren für 3 Minuten bei  $16.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes
- 4) Zugabe von 300  $\mu$ l 70 % Ethanol; Waschen des Pellets durch vorsichtiges mehrmaliges Invertieren; Zentrifugieren für 1 Minute bei  $16.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes; trocknen des RNS-Pellets im umgedrehten Mikrozentrifugengefäß auf Fließpapier für 10 Minuten
- 5) Zugabe von 48  $\mu$ l „RNA Hydration Solution“; Inkubation auf Eis für ca. 2 Stunden; vortexen für 5 Sekunden, anschließend kurz zentrifugieren; Lagerung der RNS bis zur Weiterverarbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$

### 3.9.2 RNS-Extraktion aus Zellen

Zur RNS-Extraktion wurde das Pureskript® RNS Isolierungs-Kit (Biozym, Oldendorf) verwendet.

- 1) Kultivierung der Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche, bis ca. die Hälfte bis zwei Drittel des Bodens bewachsen sind; abgiessen des Mediums und sofortige Zugabe von 600  $\mu$ l „Cell Lysis Solution“; Flasche vorsichtig schwenken; Zelllysate 3 Mal auf- und abpipettieren und in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß überführen

- 2) Zugabe von 200  $\mu$ l „Protein Precipitation Solution“ zu dem Zelllysate; vorsichtig invertieren, anschließende Inkubation auf Eis für 5 Minuten; zentrifugieren für 3 Minuten bei  $16.000 \times g$
- 3) Überführen des Überstandes in ein neues, mit 600  $\mu$ l 100 % Isopropanol versehenes 1,6 ml Reaktionsgefäß; 50 Mal vorsichtig invertieren; zentrifugieren für 3 Minuten bei  $16.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes
- 4) Zugabe von 600  $\mu$ l 70 % Ethanol; Waschen des Pellets durch vorsichtiges mehrmaliges Invertieren; zentrifugieren für 1 Minute bei  $16.000 \times g$ ; vorsichtiges Abgiessen des Überstandes; trocknen des RNS-Pellets im umgedrehten Mikrozentrifugegefäß auf Fließpapier für 10 Minuten
- 5) Zugabe von 80  $\mu$ l „RNA Hydration Solution“; Inkubation auf Eis für ca. 2 Stunden; vortexen für 5 Sekunden, anschließend kurz zentrifugieren; Lagerung der RNS bis zur Weiterverarbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$

### 3.9.3 Herstellung der cDNS

Zur Herstellung der cDNS erfolgten DNase-Behandlung und RT-Reaktion wie unter 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben, jedoch wurde nach der RT-Reaktion kein DEPC-Wasser zugegeben. Um eine ausreichende Menge zu erhalten, wurden von jeder RNS-Probe drei Doppelansätze umgeschrieben, was ein Gesamtvolumen von ca. 60  $\mu$ l ergab.

### 3.9.4 Quantifizierung der Wachstumsfaktor- und Zytokin-Transkription in Tumoren und Zelllinien im Vergleich zur Transkription in Unterhaut und kultivierten Hautfibroblasten

Die Quantifizierung erfolgte mittels der komparativen  $C_T$ -Methode (User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems; Foster City, USA), bei der die Wachstumsfaktor- und Zytokin-Transkription als relative Transkription beziehungsweise  $n$ -fache Differenz zum „housekeeping“ Gen GAPDH angegeben wird.

Der  $C_T$ -Wert ( $C_T$  = threshold cycle; Grenzwert) ist dann erreicht, wenn die Fluoreszenzintensität das 10-fache der Standardabweichung der basalen Fluoreszenz erreicht. Von jeder cDNS-Probe wurden im gleichen PCR-Lauf die  $C_T$ -Werte von sämtlichen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und des „housekeeping“ Gens GAPDH, jeweils im Doppelansatz, bestimmt. Der Mittelwert der  $C_T$ -Werte aus dem Doppelansatz, gerundet auf 2 Kommastellen, wurde für weitere Berechnungen genutzt. Somit wurden Pipettierfehler weitgehend ausgeglichen. Die Berechnung der Differenz zwischen den  $C_T$ -Werten der

Wachstumsfaktoren und Zytokine und dem  $C_T$ -Wert für GAPDH diene der Normalisierung der Unterschiede in der absoluten Nukleinsäuremenge zwischen den RNS-Proben sowie der unterschiedlichen Effizienz des RT-Schritts. Bei jeder Probe wurde der Mittelwert des  $C_T$ -Werts von GAPDH vom Mittelwert des  $C_T$ -Werts des jeweiligen Wachstumsfaktors oder Zytokins subtrahiert, wodurch sich der  $\Delta C_T$ -Wert ergab. Bei Proben, in denen nach 45 Zyklen kein Signal beobachtet werden konnte, d.h. der gemessene  $C_T$ -Wert 45 betrug, wurde mit dem  $C_T$ -Wert 45 weitergerechnet, um Mittelwert und  $\Delta C_T$ -Wert zu bestimmen.

Als Kalibrator wurde für die VAS feline Unterhaut und für die Zelllinien kultivierte Zellen aus Unterhaut genutzt. Dabei wurden von je 3 verschiedenen Tieren entsprechende cDNS-Proben aus Unterhaut und Unterhautzellen in Kultur gewonnen und im Doppelansatz gemessen. Als  $\Delta C_T$ -Wert des Kalibrators wurde der Mittelwert der  $\Delta C_T$ -Werte der verschiedenen Proben verwendet.

Es wurde für jeden Wachstumsfaktor und für jedes Zytokin ein  $\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet, indem der  $\Delta C_T$ -Wert des Kalibrators vom  $\Delta C_T$ -Wert der jeweiligen Probe subtrahiert wurde:  $\Delta\Delta C_T$ -Wert =  $\Delta C_T$ -Wert (Probe) -  $\Delta C_T$ -Wert (Kalibrator)

Anschließend wurde die relative Transkription der Proben im Vergleich zum Kalibrator mit  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  gerechnet.

Die erhaltenen Werte wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet. Lediglich in den Fällen, in denen der Wert dann Null ergeben hätte, wurde so gerundet, dass die letzte Nachkommastelle eine von Null abweichende Ziffer war.

## 4 Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden an fünf VAS mit den Tagebuchnummern T 2987/02 (T1), T 3966/02 (T2), T 6005/03 (T3), T 6966/03 (T4) und T 7012/03 (T5) sowie an Zellen von aus T1-T5 gezüchteten Zelllinien (L1-L5) durchgeführt. Als Vergleich dienten Unterhaut (KH) und aus dieser gezüchtete Zellen (KZ) von drei frischtoten Sektionskatzen mit den Tagebuchnummern S 1173/05 (A), S 1604/05 (B) und S 80/06 (C).

### 4.1 Tumoren

#### 4.1.1 Vorbericht

Mit dem Vorbericht wurden alle verfügbaren Informationen über Rasse, Alter und Geschlecht der Katzen, die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren sowie über vorangegangene Impfungen und andere Injektionen aufgenommen. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die gesammelten Informationen.

**Tabelle 4.1: Informationen aus Vorberichten**

Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Wachstums- geschwindigkeit, Besonderheiten	Impfungen, sonstige Injektionen
T1	EKH	11 J.	m	Nicht bekannt	Nicht bekannt
T2	EKH	6 J.	mk	Schnell: innerhalb von 5 Monaten; Juckreiz im Tumorbereich	Nie gegen Tollwut oder Leukose geimpft, aber 1996 (2 ×), 1998 und 2000 (2 ×) gegen infektiöse Panleukopenie geimpft
T3	EKH	12,5 J.	mk	Schnell: innerhalb von 5 Monaten	Mehrfach zwischen den Schulterblättern geimpft
T4	EKH	8 J.	mk	Nicht bekannt	Nicht bekannt
T5	Perser	11 J.	wk	Schnell, innerhalb von 2 Wochen	Vor 2 Monaten Impfung gegen RCP/T und Leukose, vor 1 Monat Nachimpfung RCP und Leukose zwischen die Schulterblätter, über den Zeitraum davor nichts bekannt

### 4.1.2 Makroskopische Befunde

Alle Tumoren stammten aus der Unterhaut im Bereich von Vakzinationsstellen: T3 war zwischen den Schulterblättern lokalisiert, während sich T1, T2, T4 und T5 lateral am Thorax befanden. Die Größe reichte von walnussgross bis doppeltfaustgroß. T2 besaß oberflächlich einen ulzerierten Bereich. Makroskopisch waren die Tumoren grau-weiss und derb, die Schnittfläche war strahlig grau-weiss. T2 bis T5 wiesen ein blutiges und/oder nekrotisches Zentrum auf. Bei T2-T5 handelte es sich um solitäre Tumore, während die Katze, von der T1 stammte, zusätzlich ein Fibrosarkom im linken Hoden hatte. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die makroskopischen Befunde.

**Tabelle 4.2: Überblick über die makroskopischen Befunde**

Nr.	Lokalisation	Größe, Sonstiges
T1	Rechts am Thorax	Kinderfaustgroß, auf Rippen fest aufsitzend
T2	Rechts am Thorax	Hühnereigroß, nekrotisches Zentrum, oberflächlich erbsengroßer Bereich ulzeriert
T3	Zwischen den Schulterblättern	Doppelfaustgroß, zentral gekammert, blutig und mit seröser Flüssigkeit gefüllt, nekrotisch
T4	Rechts am Thorax	Hühnereigroß, braunes Zentrum
T5	Links am Thorax	Walnussgroß, etwas länglich, zentral flüssigkeitsgefüllter Hohlraum

### 4.1.3 FeLV-Status

Alle untersuchten Tumoren wurden sowohl immunhistologisch als auch mittels PCR negativ auf FeLV getestet. Damit handelte es sich bei allen Tumoren um VAS.

### 4.1.4 Histopathologische Befunde

Die morphologische Charakterisierung erfolgte anhand von H.E.- und nach Goldner gefärbten Schnitten. Alle Tumoren enthielten sowohl gut als auch schlecht differenzierte Zellen sowie Zwischenformen. Die gut differenzierten Zellen waren im Durchschnitt 12-15 µm lang, schmal, langgestreckt, zytoplasmaarm und relativ monomorph. Sie wiesen einen langgezogenen, ovalen Kern mit einem Durchmesser von 4-6 µm sowie unauffällige Nukleoli auf. Die Anordnung der Zellen ähnelte einem Fischgrätmuster: Sie lagen meist geordnet in mehreren, zueinander in spitzem Winkel gekreuzten Bündeln. Die schlecht differenzierten Zellen stellten sich ca. 25-30 µm groß, zytoplasmareich und pleomorph dar. Der große, meist runde Kern erreichte bis zu 20 µm im Durchmesser, das feine Chromatin war häufig diffus

verteilt. Oft waren mehrere deutliche Nukleoli zu erkennen. Zusätzlich zu diesen beiden Zelltypen konnten auch Zellen beobachtet werden, die morphologisch Zwischenformen darstellten. Die Vergabe einer Zahl nach Couto zur Bestimmung des Differenzierungsgrades erfolgte nach dem überwiegend gefundenen Zelltyp. T1 und T2 enthielten überwiegend gut differenzierte Zellen, T3, T4 und T5 dagegen schlecht differenzierte Zellen.

T1 wies keine Nekrose auf. Bei T2 und T5 waren kleine (< 50 % der Tumorfläche) und bei T3 und T4 große (> 50 % der gesamten Tumorfläche) Nekroseareale zu erkennen.

Unter Berücksichtigung der Anzahl von in 10 HPF gefundenen Mitosen ergab sich folgender Differenzierungsgrad nach Couto (Kriterien s. 3.1.1.3, S. 25): T1 Grad I, T2 Grad II, T3-T5 Grad III.

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über Differenzierungsgrad der Zellen, Nekrose und Mitosen sowie die Ermittlung des Differenzierungsgrades.

**Tabelle 4.3: Überblick über Differenzierungsgrad der Zellen, Nekrose und Mitosen sowie Ermittlung des Differenzierungsgrades von T1-T5**

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
Zelldifferenzierung; Zahl nach Couto	gut 1	gut 1	schlecht 3	schlecht 3	schlecht 3
Nekrose; Zahl nach Couto	keine 1	< 50 % 2	> 50 % 3	> 50 % 3	< 50 % 2
Anzahl Mitosen in 10 HPF; Zahl nach Couto	11 2	14 2	31 3	16 2	11 2
Summe der Zahlen nach Couto	4	5	9	8	7
Differenzierungsgrad	I	II	III	III	III

Alle Tumoren enthielten mehrkernige Riesenzellen. Als solche wurden Zellen mit 2 oder mehr Zellkernen angesprochen. Die Größe der mehrkernigen Riesenzellen war abhängig von der Anzahl der Zellkerne. T1 besaß vereinzelt Riesenzellen mit bis zu 3 Kernen. Sie lagen in das Gewebe eingestreut und ähnelten morphologisch den Tumorzellen. T2 besaß wenige Riesenzellen mit bis zu 22 Zellkernen. Die Riesenzellen waren überwiegend am Nekroserand lokalisiert, rundlich und zytoplasmareich. In T3 waren sehr zahlreiche Riesenzellen mit bis zu 130 Zellkernen zu erkennen. Sie befanden sich sowohl am Rand der Nekrose als auch im Tumorgewebe verteilt. Sie waren ebenfalls rundlich und zytoplasmareich. T4 wies zahlreiche,

rundliche und zytoplasmareiche Riesenzellen mit bis zu 90 Kernen und Vakuolen im Zytoplasma auf. Sie lagen ebenfalls am Rand der Nekrose und im Tumorgewebe verteilt. T5 enthielt mäßig viele, im Tumorgewebe verteilte Riesenzellen von rundlicher Form mit bis zu 20 Kernen.

Bei allen Tumoren fanden sich entzündliche Infiltrate, überwiegend in der Tumorperipherie lokalisiert. Vereinzelt waren auch Entzündungszellen in das Tumorgewebe eingestreut, jedoch meistens in Randnähe. Die entzündlichen Infiltrate bestanden überwiegend aus bandartig oder nodulär angeordneten Lymphozyten und Makrophagen, vereinzelt waren auch Plasmazellen und neutrophile Granulozyten zu erkennen. Der Grad der entzündlichen Infiltration war bei allen Tumoren als hochgradig einzustufen.

T2, T3, T4 und T5 wiesen herdförmige Blutungen auf. Diese waren im Bereich der Nekrose und bei T5 zusätzlich bei den entzündlichen Infiltraten lokalisiert.

Bei T1 und T2 wurde ein hoher Gehalt an kollagenen Fasern ermittelt (> 50 % der Tumorfläche). T4 (s. Abbildung 10) und T5 enthielten wenig kollagene Fasern (< 30 % der Tumorfläche) und T3 enthielt ganz vereinzelt kollagene Fasern (< 10 % der Tumorfläche).

T3 enthielt zusätzlich zahlreiche Inseln von Osteoid.

#### **4.1.5 Auswertung der Gefrierschnitte**

Aufgrund der schlecht erhaltenen Morphologie des Gewebes der Gefrierschnitte wurde nur beurteilt, ob sie repräsentativ für den jeweiligen Tumor waren, d.h. ob Zellmorphologie, Nekrose- und Fasergehalt sowie der Grad der entzündlichen Infiltration mit den oben beschriebenen Ergebnissen vergleichbar waren. Dies war bei T1-T5 der Fall.

#### **4.1.6 Ergebnisse der Immunhistologie**

T1-T5 waren positiv für Vimentin und negativ für Desmin und Zytokeratin.

Bei T1, T2, T3 und T5 waren ca. 80-90 % der Tumorzellen positiv für  $\alpha$ -SMA, bei T4 waren es ca. 30 %. Insgesamt war die Reaktion der gut differenzierten, spindelförmigen Zellen stärker als die der plumpen, rundlichen, schlecht differenzierten Zellen. Die schlecht differenzierten Zellen von T4 waren überwiegend negativ. Die RZ waren überwiegend negativ, nur bei T3 zum Teil schwach positiv. Bei T4 betrug der Anteil der positiven Tumorzellen ca. 30 %. Die RZ waren ebenfalls negativ. Ebenfalls deutlich positiv reagierten die Glattmuskelzellen der Gefäßwände in Tumoren und Umgebung.

Die Untersuchung auf MHC II-Antigen ergab, dass bei T1 ca. 80 % der Tumorzellen positiv waren. Bei T2 waren es ca. 50 %, bei T3 5 % und bei T4 und T5 ca. 40 %. Die RZ waren



negativ. Weitgehend positiv waren die entzündlichen Infiltrate, es waren aber bei allen VAS auch negative Entzündungszellen zu finden.

#### **4.1.7 Ergebnisse der Enzymhistochemie**

In T1 konnte keine TRAP-positive Reaktion nachgewiesen werden. In T2 waren ganz vereinzelt TRAP-positive Zellen, bei denen es sich ausschließlich um RZ handelte, zu erkennen. Der überwiegende Anteil der RZ war negativ. Bei T3 waren ca. 60 % der Zellen positiv. Dabei handelte es sich überwiegend um RZ, eine positive Reaktion wurde aber auch in einkernigen Tumorzellen beobachtet. Bei der Mehrzahl der RZ war das gesamte Zytoplasma deutlich dunkelviolettfärbt. Andere RZ waren vollständig oder nur an einer Seite schwach violett gefärbt. Darüber hinaus waren auch negative RZ vorhanden. T4 enthielt zu ca. 5 % positive Tumorzellen. Dabei handelte es sich fast nur um RZ, aber auch um mononukleäre Zellen (s. Abbildung 12). Die Mehrzahl der RZ in T4 war jedoch TRAP-negativ (s. Abbildung 12). Bei T5 waren ca. 20 % der Zellen positiv. Auch hier dominierten RZ, wobei auch T5 sowohl positive mononukleäre Zellen als auch negative RZ enthielt.

## **4.2 Zelllinien**

Von 24 in Kultur genommenen VAS konnten aus 5 VAS (T1-T5) Zelllinien (L1-L5) etabliert werden. Diese befanden sich 4 (L5) bis 5,5 (L1) Jahre ununterbrochen in Kultur und wurden nach Abschluss der Untersuchungen in den Passagen P231 (L1), P180 (L2), P170 (L3), P165 (L4) und P153 (L5) eingefroren. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich um permanente Zelllinien handelt.

Von den restlichen 19 VAS ließen sich zwar Zellen anzüchten, diese starben jedoch in Primärkultur oder spätestens in P6, so dass keine permanenten Zelllinien etabliert werden konnten.

### **4.2.1 Morphologie und Verhalten in Gewebekultur**

Die Zellen von L1-L4 sind überwiegend spindelförmig mit langen, z.T. verzweigten Ausläufern (s. Abbildung 20 - Abbildung 23). Es gibt aber auch dreieckige bis polygonale Zellen, die ebenfalls lange, z.T. verzweigte Ausläufer aufweisen (s. Abbildung 20 - Abbildung 23). Diese Zellen besitzen einen Kern mit einem oder mehreren Nukleoli. Wenn der Zellrasen dichter wird, ordnen sich die Zellen ähnlich dem Bild der gut differenzierten Zellen der Primärtumoren in einer Art Fischgrätmuster an: in mehreren, zueinander in spitzem Winkel gekreuzten Bündeln (s. Abbildung 21). Diese Anordnung ist bei L1 und L2 am

deutlichsten ausgeprägt. Zusätzlich sind mehrkernige Zellen polygonaler, aber immer gestreckter Form mit Ausläufern zu erkennen (s. Abbildung 22 und Abbildung 23). Die Anzahl beträgt bis zu ca. 10 Kernen pro Zelle bei L1, L2 und L4 und bis zu ca. 20 Kernen bei L3. Bei L3 und L4 sind mehrkernige Zellen zahlreicher als bei L1 und L2.

Etwas anders ist die Morphologie der Zellen von L5: Diese bestehen vorwiegend aus rundlichen oder dreieckigen bis polygonalen, einkernigen und fast nicht aus spindelförmigen, einkernigen Zellen. Eine deutliche Ordnung bei dichter werdendem Zellrasen wie bei L1-L4 ist nicht zu erkennen. Weiterhin gibt es mehrkernige Zellen, die rundlich und nicht gestreckt sind. Ihre bis zu ca. 10 Kerne liegen zentral und sind von einem breiten Zytoplasmasaum umgeben. Sie sind bis zu 20 Mal größer als die kleineren, einkernigen, polygonalen Zellen (s. Abbildung 24). Daneben gibt es auch rundliche Zellen mit nur einem Kern, die bis zu 10 Mal größer sind als die kleinen, polygonalen einkernigen Zellen, also „einkernige Riesenzellen“ (s. Abbildung 25).

Die Zellen aller Linien wuchsen nicht nur im Monolayer, sondern teilweise auch übereinander. Dieses Phänomen nahm bei steigender Dichte des Zellrasens zu. An einigen Stellen bildeten sich „Minitumoren“: Dabei handelt es sich um dreidimensionale Gebilde. Die großen, runden ein- und mehrkernigen Zellen von L5 wurden zunächst umwachsen, später jedoch auch überwachsen. Wenn der Zellrasen sehr dicht war, kugelten sich die Zellen aller Linien ab und schwammen im Medium. In eine neue Kulturflasche verbracht, erwies sich ein Teil der Zellen als noch lebensfähig und wuchs wieder an.

Morphologie und Wachstumsverhalten veränderten sich mit zunehmender Passagezahl nicht. Bei -196 °C eingefrorene Zellen zeigten nach dem Auftauen und der erneuten Kultivierung ebenfalls keine Veränderungen.

#### **4.2.2 Zytologische Befunde**

Zur besseren Beurteilung der Morphologie wurden auch Pappenheim-gefärbte Chamberslides, die zu ca. 1/2 bis 2/3 mit Zellen bewachsen waren, ausgewertet. Die Morphologie der Zellen aller Linien entsprach der in den Zellkulturflaschen (s. Abbildung 14 - Abbildung 19). Zusätzlich waren auch in L1, L3 und L4 einkernige Zellen zu erkennen, die ungefähr 2-4 Mal so groß waren wie die Mehrzahl der einkernigen Zellen und in Kultur nicht besonders auffielen (s. Abbildung 17). L3 war die Linie mit der deutlichsten Anisokaryose. Bei allen Linien waren zahlreiche, häufig bizarre Mitosen zu erkennen (s. Abbildung 14).

Mittels Goldner-gefärbter Schnitte wurde bei L4 vereinzelt extrazellulär liegendes, positiv reagierendes Material gefunden (s. Abbildung 11). Bei L4 wurde auch vereinzelt intrazellulär eine positive Reaktion beobachtet. Dabei handelte es sich um Kollagen bzw. Prokollagen.

#### 4.2.3 Immunzytologische Befunde

Die Zellen aller Linien waren positiv für Vimentin und negativ für Desmin und Zytokeratin. Bei L1-L5 waren die Zellen zu annähernd 100 % positiv für  $\alpha$ -SMA. Die Zahl der Zellen, die schwach bis stark positiv auf MHC II-Antigen reagierten, betrug bei L1 ca. 30 %. Bei L2, L3 und L4 konnten vereinzelt schwach positiv reagierende Zellen gefunden werden, von denen keine mehrkernig war. L5 enthielt keine für MHC II-Antigen positiven Zellen.

#### 4.2.4 Enzymzytochemische Befunde

Bei Zellen von L1-L5 konnte keine TRAP-positive Reaktion nachgewiesen werden (s. Abbildung 13).

#### 4.2.5 Rasterelektronenmikroskopische Befunde

Bei rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung bestätigte sich die lichtmikroskopisch festgestellte Morphologie der Zellen als langgestreckt, rundlich oder polygonal (s. Abbildung 29 - Abbildung 31). Der Zellkörper war flach und im Bereich des Kerns oder der Kerne aufgewölbt (s. Abbildung 31). Deutlich waren zahlreiche, lange, fadenförmige, mehrfach verzweigte Ausläufer zu erkennen, die bereits bei geringer Zelldichte übereinander wuchsen (s. Abbildung 29 und Abbildung 30).

#### 4.2.6 Auswertung der Chromosomenanalyse

Die Chromosomenanalyse wurde bei L1 in P82, bei L2 in P74, bei L3 in P48, bei L4 in P42 und bei L5 in P36 durchgeführt. Von L1 wurden 15 Zellen ausgewertet, von L2-L5 wurden jeweils 25 Zellen ausgewertet. Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über Minimum, Maximum und Median der Chromosomenanzahl bei den einzelnen Zelllinien. Eine genaue Auflistung der Auszählung findet sich im Anhang (vgl. Tabelle 8.1).

**Tabelle 4.4: Überblick über Minimum, Maximum und Median der Chromosomenzahl bei L1-L5**

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>
Minimum	27	27	23	36	38
Maximum	64	113	144	60	158
Median	47	47	66	46	62

In Abbildung 1 ist die relative Häufigkeit der Chromosomenzahl graphisch dargestellt.

**Abbildung 1: Verteilung der Häufigkeit der Chromosomenzahl in den Zelllinien L1 bis L5**

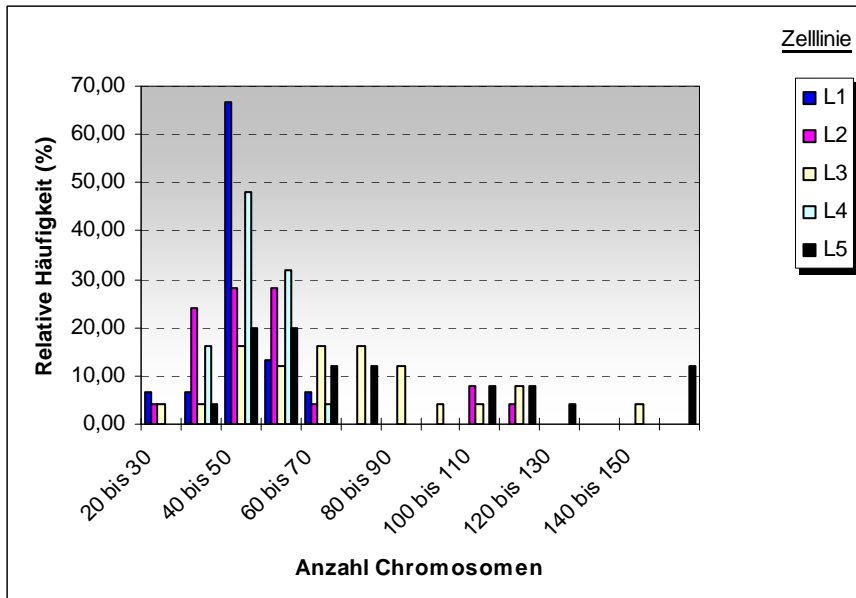
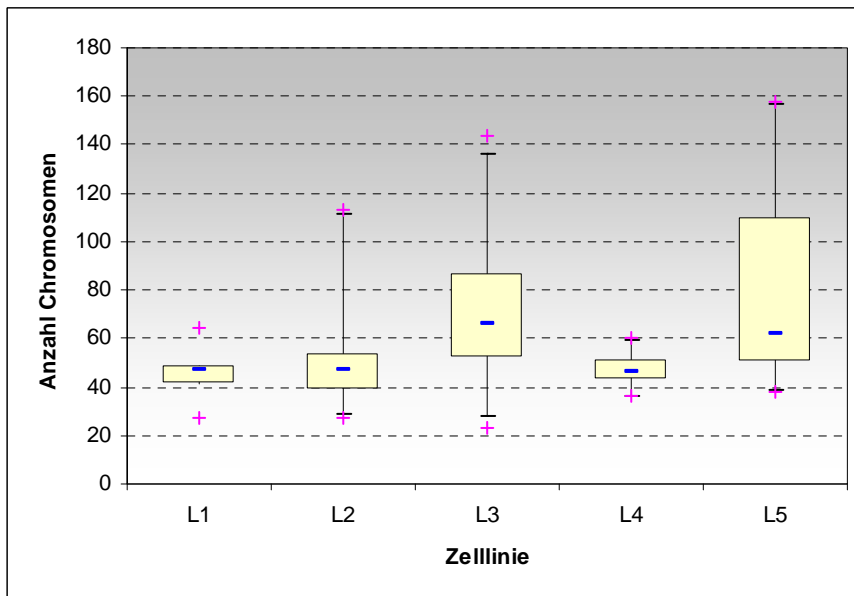


Abbildung 2 zeigt die Chromosomenanzahlen von L1-L5 mittels Box-and-Whisker-Plot.

**Abbildung 2: Box-and-Whisker-Plot zur Darstellung der Chromosomenanzahl bei L1-L5**



+ unten: Minimum

+ oben: Maximum

-: Median

Die oberen und unteren Ränder der Rechtecke entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen. Damit fallen 50 % der Daten in die Rechtecke und 50 % außerhalb. Die Whiskers markieren die 5. und 95. Perzentile. Bei L1 fallen die 5. und 25. sowie die 75. und 95. Perzentilen zusammen, deshalb überlagern sich der obere und untere Rand des Rechtecks mit den Whiskers.

Bei L2 trat bei Chromosom 1 eine achromatische Region auf, die in nahezu allen untersuchten Zellen gefunden wurde (s. Abbildung 28). Hierbei scheint es sich um ein Markerchromosom zu handeln.

### 4.3 Kontrollen

Als Kontrollen diente Unterhaut von 3 Katzen, die frishtot in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sektion gebracht worden waren (A: S 1173/05, B: S 1604/05 und C: S 80/06). Alle Katzen litten nicht an einem VAS und waren aus anderen Gründen eingeschläfert worden. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über Rasse, Alter, Geschlecht, Erkrankung und Todesart dieser Tiere.

**Tabelle 4.5: Überblick über die Katzen, von denen die Kontrollen stammen**

<b>Katze</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Sektionsbefunde</b>	<b>Todesart</b>
A	EKH	3,5 Monate	w	Anämie, Hämothorax, Häm-askos, Zwerchfellruptur, Ruptur der linken Bauchwand, Lungenblutungen, multiple Leberrupturen (vermutlich als Folge eines Autounfalls)	euthanasiert
B	Perser	20 Jahre	wk	Multifokale, chronische, sklerosierende, interstitielle Nephritis, Hyperplasie der Epithelkörperchen, Meninx- und Ventrikelblutung	euthanasiert
C	EKH	10 Jahre	mk	Pankreaskarzinom mit Lebermetastasen; Perisplenitis	euthanasiert

Eine histologische Untersuchung der Haut im Querschnitt in der Nähe der Lokalisation, die für die Extraktion verwendet wurde, zeigte keine Besonderheiten. Hauterkrankungen wurden

nicht festgestellt. Proben aller Katzen wurden immunhistologisch und mittels PCR negativ auf FeLV-Antigen getestet.

Aus der Unterhaut dieser Katzen konnten auch Zellen angezüchtet werden, die morphologisch und immunhistologisch als Fibroblasten identifiziert wurden. Sie waren von langgestreckter, z.T. auch polygonaler Form mit langen, fadenförmigen Ausläufern. Sie besaßen in der Regel einen, vereinzelt auch zwei ovale Kerne (s. Abbildung 26). Immunhistologisch stellten sie sich als positiv für Vimentin und  $\alpha$ -SMA sowie negativ für Desmin und Zytokeratin dar. Etwa 30 % der Zellen waren MHC II-positiv.

Mittels Goldner-Färbung wurde extrazellulär liegendes, positives Material nachgewiesen, was als Kollagenproduktion gewertet wurde.

Die Zellen besaßen eine so geringe Proliferationsaktivität, dass nicht genug Material für eine Chromosomenanalyse gewonnen werden konnte.

#### **4.4 Ermittelte Teilsequenz für felines FGF-2 und Primer-Sonden-System**

Für felines FGF-2 wurde durch Klonierung und Sequenzierung folgende cDNS Teilsequenz ermittelt, die eine Homologie von 94 % mit der humanen cDNS-Sequenz (Acc. Nr. NM\_002006) aufweist:

**CCACTTCAAGGACCCCAAGCGTCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCG  
CATCCACCCCGACGGCCGAGTGGATGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACAT  
CAAAGTGCAACTTCAGGCAGAAGAGAGAGGGGGTTGTGTCCATCAAAGGAGTCT  
GTGCAAACCTCGCTATCTTGCCATGAAGGAAGATGGAAGAT**

Die Sequenz wurde in die Gendatenbank der NCBI eingestellt und ist unter der Acc. Nr. EU314952 zugänglich.

Anhand dieser Sequenz wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ludger Fink, Institut für Pathologie des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen, die folgende Primer-Sonden-Kombination entwickelt:

Primer forward	5'-GCTTCTTCCTGCGCATCCA-3'
Primer reverse	5'-CCCCTCTCTTCTGCCTGAA-3'
Sonde	5'-ACCCTCACATCAAAGTGCAAAC-3'

Die Position der Primer ist fett, die Position der Sonde ist fett und kursiv dargestellt. Der vermutete Exon-Exon-Übergang ist unterstrichen. Das Amplikon dieses Systems hat eine Länge von 99 bp.

#### 4.5 Spezifität der TaqMan-Primer und -Sonden für felines EGF, PDGF, TGF $\beta$ 1 und FGF-2

Die Sequenzen der in einen Vektor ligierten und vervielfältigten PCR-Produkte für felines TGF $\beta$ 1 und felines FGF-2 waren mit den Sequenzen, die für die Erstellung der Taqman-Systeme verwendet wurden, identisch. Die Sequenz des PCR-Produkts für felines PDGF enthielt im vermuteten Exon-Exon-Übergang und damit im Bereich der geplanten Sonde vier Basen mehr als die für die Erstellung des Systems verwendete, in der NCBI veröffentlichte Sequenz (Acc. Nr. X05112). Abbildung 3 zeigt eine Gegenüberstellung der veröffentlichten Katzensequenz mit der selbst ermittelten Sequenz. Die zusätzlichen Basen sind unterstrichen.

**Abbildung 3: Gegenüberstellung cDNS-Sequenzen felines PDGF: NCBI - selbst ermittelte Sequenz**

```

NCBI   : 1594 TGAGACGGTGGTGGCTGCACGACCCGTGACCCGAAGCCCGGGGAGCTCCCAAGAGCAGCG
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
selbst: 87  TGAGACGGTGGTGGCTGCACGACCCGTGACCCGAAGCCCGGGGAGCTCCCAAGAGCAGCG

NCBI   : 1650 ----AGGACACCCCAGACTCGGGTGACCATTTCG 1682
          ||||||||||||||||||||||||||||
selbst: 149 AGCCAGGACACCCCAGACTCGGGTGACCATTTCG 179
  
```

Da auch die in der NCBI veröffentlichte cDNS-Sequenz für humanes PDGF (Acc. Nr. M12783) in diesem Bereich vier Basen mehr enthielt, wurde die Sequenz des ligierten und vervielfältigten PCR-Produkts als richtig angesehen und für die Entwicklung der folgenden neuen Sondensequenz (Exon-Exon-Übergang unterstrichen) verwendet:

5'-CAGCGAGCCAGGACACCCCAGA-3'

Da die ursprünglichen Primer beibehalten wurden, verlängerte sich die Länge des PCR-Produkts um 4 bp auf 99 bp.

Die selbst ermittelte Teilsequenz für PDGF wurde in die Gendatenbank der NCBI eingestellt und ist unter der Acc. Nr. EU314951 zugänglich.

Die Sequenz des PCR-Produkts für felines EGF enthielt an einer Stelle, die weder im Bereich der Primer noch im Bereich der geplanten Sonde lag, 7 Basen (AAAAAAA) mehr als die für die Erstellung des Systems verwendete, in der NCBI veröffentlichte Sequenz (Acc. Nr. AB050947). Da diese Stelle weder im Bereich der Primer noch im Bereich der geplanten Sonde lag, wurden die Sequenzen für Primer und Sonde beibehalten. Auch die in der NCBI veröffentlichte cDNS für humanes EGF (Acc. Nr. NM\_001963) enthält an dieser Stelle 7 Basen mehr als die in der NCBI veröffentlichte cDNS Sequenz für felines EGF. Abbildungen 4 und 5 zeigen eine Gegenüberstellung der veröffentlichten Katzen- bzw. Humansequenz mit der selbst ermittelten Sequenz. Die zusätzlichen Basen sind unterstrichen.

**Abbildung 4: Gegenüberstellung cDNS-Sequenzen feliner EGF: NCBI – selbst ermittelte Sequenz**

```

NCBI   :1370 AATGTGGTTGCTTTTCCTGGGTATGACCTACAACCTGGAC-----GTTGTGCAGCATCAG
          |||||||
selbst:73  AATGTGGTTGCTTTTCCTGGGTATGACCTACAACCTGGACAAAAAAAGTTGTGCAGCATCAG

NCBI   : 1430 GACCACAGCCATTTTGTGCTGTTTGCCAATTC 1460
          |||||||
selbst:133 GACCACAGCCATTTTGTGCTGTTTGCCAATTC 163

```

**Abbildung 5: Gegenüberstellung der cDNS-Sequenzen humanes EGF NCBI – selbst ermittelte Sequenz felines EGF**

```

NCBI   :1821 AATGTGATTGCTTTTCCTGGGTATGACCTACAACCTGGATGAAAAAAGCTGTGCAGCTTCAG
          ||||| |||||||
Selbst:73  AATGTGGTTGCTTTTCCTGGGTATGACCTACAACCTGGACAAAAAAAGTTGTGCAGCATCAG

NCBI   :1881 GACCACAACCATTTTGTGCTGTTTGCCAATTC 1911
          ||||| |||||||
selbst:133 GACCACAGCCATTTTGTGCTGTTTGCCAATTC 163

```

Im Oktober 2007 wurde in die Datenbank der NCBI eine überarbeitete Version der cDNS-Sequenz für felines EGF eingestellt (Acc. Nr.: NM\_001009381), zu der die selbst ermittelte Sequenz identisch ist.

## 4.6 Optimierung der TaqMan-Real-Time PCR

Für EGF und FGF-2 ergaben eine Primer-Endkonzentration von 300 nM und eine Sonden-Endkonzentration von 100 nM die besten Ergebnisse. Für PDGF wurden eine optimale Primer-Endkonzentration von 300 nM und eine optimale Sonden-Endkonzentration von



150 nM ermittelt. Bei TGF $\beta$ 1 brachten eine Primer-Endkonzentration von 300 nM und eine Sonden-Endkonzentration von 200 nM die besten Ergebnisse. Demnach setzten sich die Ansätze für die TaqMan-PCR wie folgt zusammen:

**Tabelle 4.6: Master-Mix für EGF, FGF-2**

Komponenten	Menge	Endkonzentration/Zusammensetzung
TaqMan Universal PCR Mastermix	12,5 $\mu$ l	
Primer f [10 $\mu$ l]	0,75 $\mu$ l	[300 nM]
Primer r [10 $\mu$ l]	0,75 $\mu$ l	[300 nM]
Sonde [10 $\mu$ l]	0,25 $\mu$ l	[100 nM]
RNase-freies Wasser	5,75 $\mu$ l	
cDNS	5,0 $\mu$ l	

**Tabelle 4.7: Master-Mix für PDGF**

Komponenten	Menge	Endkonzentration/Zusammensetzung
TaqMan Universal PCR Mastermix	12,5 $\mu$ l	
Primer f [10 $\mu$ l]	0,75 $\mu$ l	[300 nM]
Primer r [10 $\mu$ l]	0,75 $\mu$ l	[300 nM]
Sonde [10 $\mu$ l]	0,375 $\mu$ l	[150 nM]
RNase-freies Wasser	5,625 $\mu$ l	
cDNS	5,0 $\mu$ l	

**Tabelle 4.8: Master-Mix für TGF $\beta$ 1**

Komponenten	Menge	Endkonzentration/Zusammensetzung
TaqMan Universal PCR Mastermix	12,5 $\mu$ l	
Primer f [10 $\mu$ l]	0,75 $\mu$ l	[300 nM]
Primer r [10 $\mu$ l]	0,75 $\mu$ l	[300 nM]
Sonde [10 $\mu$ l]	0,5 $\mu$ l	[200 nM]
RNase-freies Wasser	5,5 $\mu$ l	
cDNS	5,0 $\mu$ l	

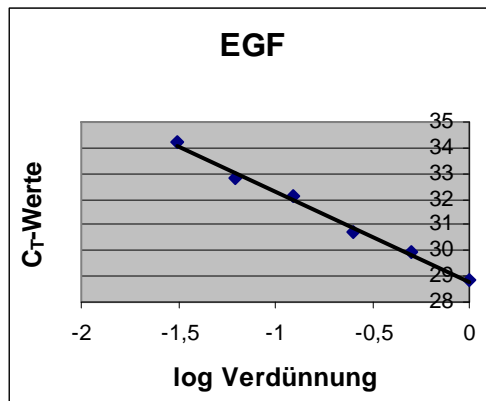
Eine Bestimmung der cDNS-Menge erfolgte nicht, da keine absolute quantitative Bestimmung der mRNS, sondern eine relative quantitative Bestimmung der

Wachstumsfaktor- bzw. Zytokin-mRNS im Vergleich zur GAPDH-mRNS in der jeweiligen Probe und zu einem Kalibrator (Kontrollen) durchgeführt wurde.

#### 4.7 Bestimmung der Effizienz der Systeme für EGF, FGF-2, PDGF und TGFβ1

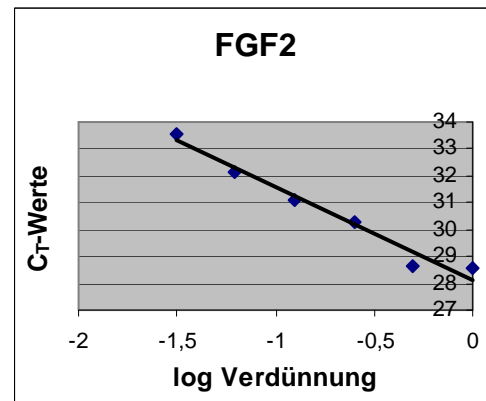
Die Effizienz der Systeme für EGF, FGF-2, PDGF und TGFβ1 betrug zwischen 91 und 97 Prozent. Einen Überblick über die Steigung Regressionsgraden und die Effizienzen gibt Abbildung 6. Die Effizienz des Systems für GAPDH wird in der Literatur mit 94,6 % angegeben (Leutenegger et al., 1999). Da alle Effizienzen zwischen 90 und 100 Prozent betrugen, konnte die Komparative  $C_T$ -Methode verwendet werden.

Abbildung 6: Steigung der Regressionsgraden und Effizienzen



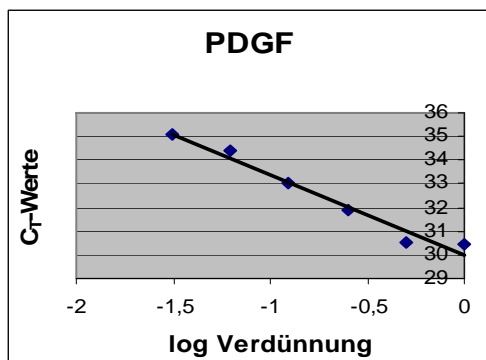
Steigung der Regressionsgraden: -3,4925

Effizienz: 93 %



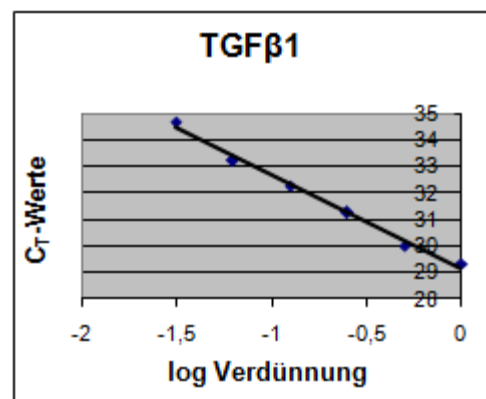
Steigung der Regressionsgraden: -3,4349

Effizienz: 95 %



Steigung der Regressionsgraden: -3,3865

Effizienz: 97 %



Steigung der Regressionsgraden: -3,5497

Effizienz: 91 %

#### 4.8 Bestimmung der Transkription von EGF, FGF-2, PDGF, TGF $\beta$ 1, TNF und IL-1 in Tumoren und Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen

Die Bestimmung der Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription der Zelllinien erfolgte bei L1 in P135, bei L2 in P125, bei L3 in P73, bei L4 in P67 und bei L5 in P60.

Die Ergebnisse der im Doppelansatz gemessenen Proben schwankten gering bis mäßig ( $|C_T \text{ Pr1} - C_T \text{ Pr2}|$  zwischen 0,01 und 5,81; Intra-Assay-Streuung). Außerdem war teils nur in einer Probe des Doppelansatzes mRNA nachweisbar. Das war insbesondere dann der Fall, wenn sehr hohe  $C_T$ -Werte gemessen wurden. Die Ergebnisse zur Intra-Assay-Streuung sind für sämtliche untersuchten Proben in Tabelle 4.9 detailliert aufgelistet.

**Tabelle 4.9: Differenzen zwischen den  $C_T$ -Werten der Doppelansätze (Differenz = 0 immer dann, wenn bei beiden Proben kein Wert gemessen wurde)**

	$ C_T \text{ Pr1} - C_T \text{ Pr2} $						
	EGF	FGF-2	PDGF	TGF $\beta$	IL-1	TNF	GAPDH
<b>T1</b>	1,63	2,23	0,04	0,24	0,04	0,48	0,07
<b>T2</b>	1,73	1,15	0,53	0,64	0,06	0,20	1,65
<b>T3</b>	0	1,43	0,04	0,12	0,15	1,86	0,06
<b>T4</b>	0,93	0,07	1,23	1,03	0,33	0,1	0,22
<b>T5</b>	0,13	1,28	0,61	0,42	0,36	0,16	0,24
<b>L1</b>	0	0,08	0,37	0,3	0	#	1,26
<b>L2</b>	0	0,22	0	0,26	0	0	0,03
<b>L3</b>	#	0,19	0,81	0,76	0	#	0,67
<b>L4</b>	0	0,03	0,92	0,42	0	0,35	0,59
<b>L5</b>	0	0,15	2,51	0,2	0	0	0,6
<b>KHA</b>	1,63	0,34	2,37	0,06	0	2,52	0,13
<b>KHB</b>	2,61	0,12	0,5	0,45	1,79	0,26	0,68
<b>KHC</b>	0,41	0,19	0,04	0,43	0,11	0,59	0,01
<b>KZA</b>	#	0,1	0,79	0,18	#	#	0,33
<b>KZB</b>	0	0,14	0,89	0,43	0,03	0,53	1,63
<b>KZC</b>	0	5,81	0,07	1,74	0,36	0,44	0,39

Pr1, Pr2: Proben im Doppelansatz

KHA-C: Kontrollunterhaut der Katzen A-C; KZA-C: Kontrollzellen der Katzen A-C

#: mRNA wurde nur in einer Probe des Doppelansatzes nachgewiesen

Eine Aufstellung sämtlicher gemessener  $C_T$ -Werte aller Proben sowie der Mittelwerte der gemessenen  $C_T$ -Werte findet sich im Anhang in Tabelle 8.2 (alle Werte) und Tabelle 8.3 (Mittelwerte).

Die Mittelwerte der im Doppelansatz gemessenen GAPDH- $C_T$ -Werte aller Proben lagen zwischen 22,24 bei T4 und 26,14 bei KZA. In allen untersuchten Proben konnte GAPDH mRNA nachgewiesen werden.

FGF-2 und TGF $\beta$ 1 mRNA wurden ebenfalls in allen untersuchten Proben nachgewiesen. EGF mRNA wurde in den Proben von T1, T2, T4 und T5 sowie KHA-KHC nachgewiesen. Bei T3 konnte keine Transkription von EGF nachgewiesen werden. Bei den Zellen wurden lediglich bei L3 und KZA in jeweils einer von zwei Proben eine geringe Menge ( $C_T$ -Wert > 36) EGF mRNA nachgewiesen. PDGF mRNA fand sich in allen Proben bis auf L2. IL-1 mRNA wurde in allen Proben von T1-T5 und in keiner Probe von L1-L5 nachgewiesen. Bei den Kontrollen wurde in beiden Proben von KHA sowie einer Probe von KZA keine IL-1 mRNA gefunden. TNF mRNA konnte in allen Proben von T1-T5 nachgewiesen werden. In den Proben der Zelllinien wurde keine (beide Proben von L2 und L5, jeweils eine Probe von L1 und L3) oder nur eine sehr geringe Menge ( $C_T$ -Wert > 38) TNF mRNA gefunden.

Für die relative Wachstumsfaktor- und Zytokinbestimmung der Tumoren und Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen wurde mit einem Mittelwert der einzelnen  $\Delta C_T$ -Werte der Kontrollen A-C gebildet. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

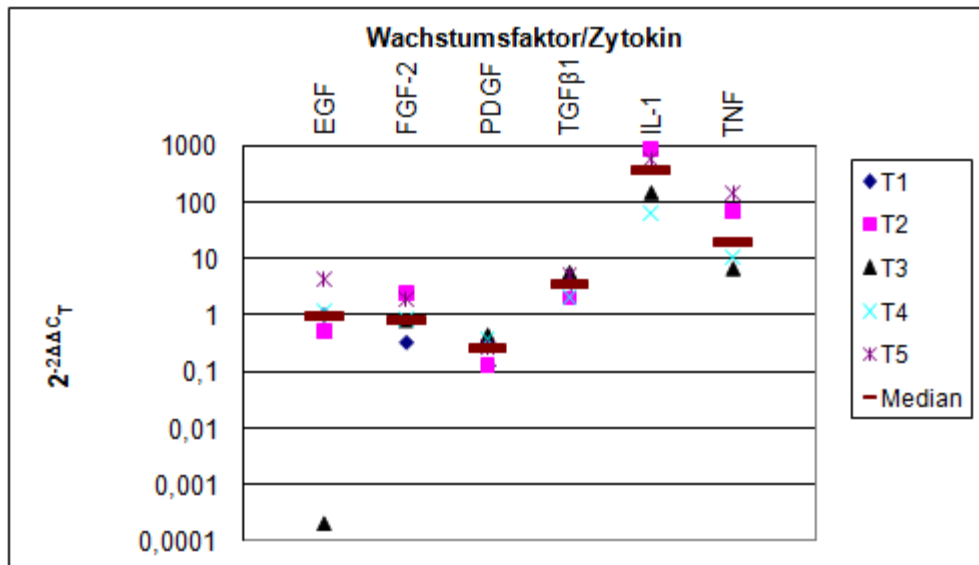
Die Differenzen zwischen den Mittelwerten der einzelnen  $\Delta C_T$ -Werte bei den verschiedenen Tieren lagen zwischen 0,17 und 9,69. Große Differenzen ergaben sich vor allem dann, wenn hohe  $C_T$ -Werte gemessen wurden, d.h. wenig mRNA des entsprechenden Wachstumsfaktors oder Zytokins nachgewiesen werden konnte wie bei IL-1, aber auch TNF.

**Tabelle 4.10:  $\Delta C_T$ -Werte der Kontrollen und daraus gebildete Mittelwerte**

	<b>EGF</b>	<b>FGF-2</b>	<b>PDGF</b>	<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	<b>IL-1</b>	<b>TNF</b>
KHA	7,36	11,62	7,02	7,60	20,40	12,66
KHB	12,17	5,83	4,06	3,67	15,62	14,19
KHC	12,00	6,08	3,58	2,05	11,43	9,67
<b>Mittelwert KH</b>	10,51	7,84	4,89	4,44	15,82	12,17
KZA	14,86	5,01	9,45	2,79	16,07	15,65
KZB	18,93	5,23	9,72	3,02	6,38	7,65
KZC	20,84	8,27	13,95	4,42	11,38	9,62
<b>Mittelwert KZ</b>	18,21	6,17	11,04	3,41	11,28	10,97

Die relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription der Tumoren im Vergleich zum Kontrollgewebe wurde mit der Formel  $y = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  berechnet und ist in Abbildung 7 als Diagramm dargestellt. Der Y-Wert 1 entspricht einer gleichstarken Transkription des Wachstumsfaktors bzw. Zytokins in Tumoren und Kontrollgewebe.

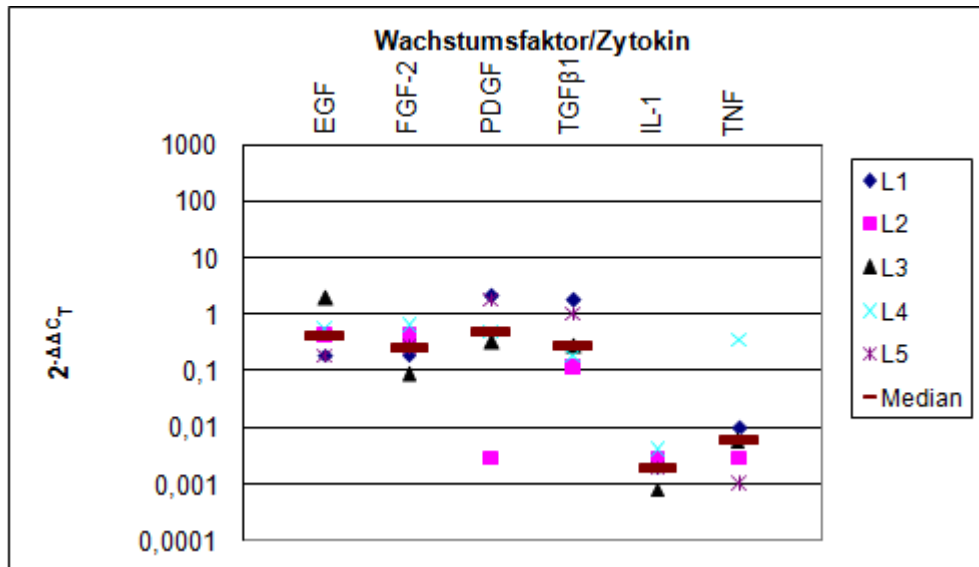
**Abbildung 7: Relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Tumoren im Vergleich zum Kontrollgewebe**



Es fällt auf, dass die Werte der verschiedenen Tumoren relativ dicht beieinander lagen. Eine Ausnahme stellt der Wert von EGF bei T3 dar, da eine Transkription von EGF bei T3 nicht nachgewiesen werden konnte. Im Mittel war die Transkription von EGF und FGF-2 in den Tumoren im Vergleich zum Kontrollgewebe unverändert. Eine leichte Abregulierung fand sich bei der Transkription von PDGF. Leicht aufreguliert war dagegen die Transkription von TGFβ1. Stärker aufreguliert war die Transkription von TNF und die stärkste Aufregulierung der Transkription war bei IL-1 zu erkennen.

Die relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde ebenfalls mit der Formel  $y = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  berechnet und ist in Abbildung 8 als Diagramm dargestellt. Der Y-Wert 1 entspricht einer gleichstarken Transkription des Wachstumsfaktors bzw. Zytokins in Zelllinien und Kontrollzellen (Mittelwert der drei Kontrollzelllinien).

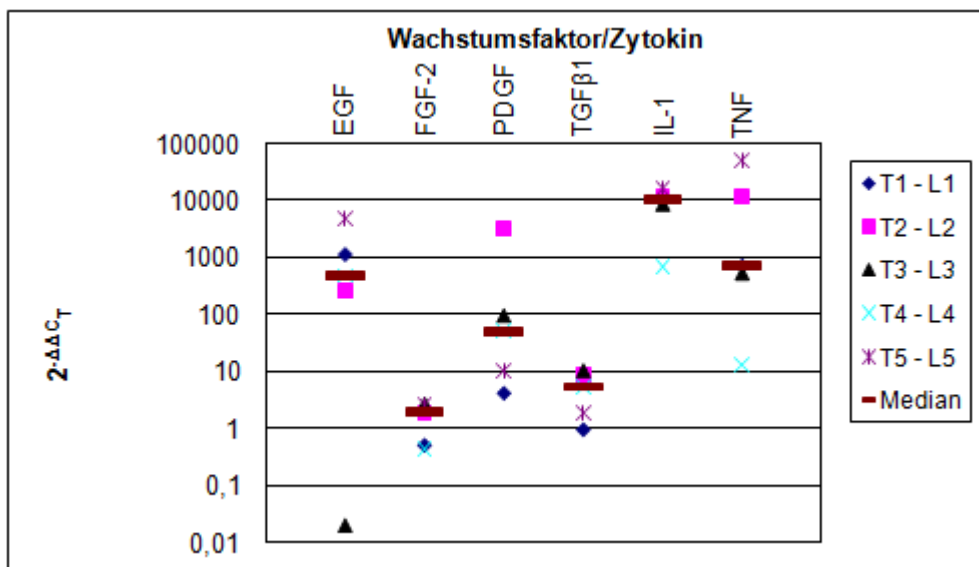
**Abbildung 8: Relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen**



Auch hier lagen die Werte relativ dicht beieinander bis auf „Ausreißer“ bei der Transkription von PDGF in L2 und von TNF in L4. Insgesamt war im Mittel die Transkription aller Wachstumsfaktoren und Zytokine in den Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert; bei EGF, FGF-2, PDGF und TGFβ1 leicht und bei IL-1 und TNF stark.

Weiterhin wurde noch die Transkription in den Tumoren mit der Transkription in den entsprechenden Zelllinien verglichen (T – L). Das Ergebnis ist in Abbildung 9 als Diagramm dargestellt.

**Abbildung 9: Relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Zelllinien**



Bei diesem Vergleich fallen größere Unterschiede zwischen den Werten auf, insbesondere bei PDGF und TNF. Insgesamt produzierten alle Tumoren im Vergleich zu den Zelllinien im Mittel mehr Wachstumsfaktoren und Zytokine; bei FGF-2, TGF $\beta$ 1 und PDGF leicht bis mäßig und bei EGF, IL-1 und TNF sehr stark. Eine Ausnahme stellt der Vergleich der EGF-Transkription in T3 und L3 dar, da in T3 keine EGF-Transkription nachgewiesen werden konnte.

## 5 Diskussion

Bei feline VAS handelt es sich um Tumoren, die meistens deutliche Infiltrate mit Entzündungszellen aufweisen und für deren Entstehung eine vorangegangene Entzündung zumindest mitverantwortlich gemacht wird. In der Literatur finden sich erst wenige Untersuchungen zu entzündungsrelevanten Wachstumsfaktoren und Zytokinen in VAS und diese sind – bis auf die Untersuchung an Impfstellen durch Carroll (2003) – immunhistologisch durchgeführt worden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Transkription von EGF, FGF-2, PDGF, TGF $\beta$ 1, IL-1 und TNF in vivo in VAS nachzuweisen und sowohl mit der Transkription in unveränderter Unterhaut als auch mit der Transkription in vitro in aus VAS gewonnenen Zelllinien zu vergleichen, um einen Hinweis auf ihre mögliche Bedeutung bei der Pathogenese von VAS zu erhalten. Für die in vitro-Untersuchungen wurden zunächst entsprechende Zelllinien etabliert und charakterisiert.

### 5.1 Tumoren

#### 5.1.1 Epidemiologie

Zunächst werden die eigenen Ergebnisse mit epidemiologischen Studien aus der Literatur in Verbindung gebracht. Dabei ist zu bedenken, dass die geringe Fallzahl von fünf Tumoren für eine statistische Aussage nicht geeignet ist und deshalb nur beurteilt werden soll, ob die Ergebnisse in etwa übereinstimmen oder ob sich grobe Abweichungen finden.

Als Durchschnittsalter für das Auftreten eines VAS werden in der Literatur teilweise ca. 8 Jahre angegeben (Doddy et al., 1996; Hendrick et al., 1994). Zu einem etwas höheren Alter von ca. 10 Jahren kamen Bleier (2003); Couto et al. (2002) und Romanelli et al. (2008). Kass et al. (1993) stellten dagegen eine bimodale Altersverteilung mit Häufungen bei sechs- bis sieben- und zehn bis elfjährigen Katzen fest. Der selbst ermittelte Altersdurchschnitt von 9,7 Jahren liegt damit etwas unter dem von Bleier (2003), Couto et al. (2003) und Romanelli et al. (2008) ermittelten Wert und entspricht genau dem von Haas (2008) ermittelten Wert. Ein Zusammenhang mit Geschlecht, Rasse oder Kastrationsstatus ist in der Literatur nicht beschrieben (Bleier, 2003; Doddy et al., 1996; Hirschberger und Kessler, 2001). Selbst bei der geringen Anzahl von 5 Tumoren waren Tiere beiderlei Geschlechts (vier männlich, eines weiblich), mit unterschiedlichem Kastrationsstatus (vier kastriert, ein männliches Tier unkastriert) und verschiedener Rassen (vier EKH, eine Perserkatze) betroffen. Alle



untersuchten Tumoren T1-T5 stammten von Impflokalisationen: T3 aus dem Bereich zwischen den Schulterblättern und die anderen seitlich vom Thorax. Vorausgegangene Impfungen an entsprechender Lokalisation waren im Fall von T2 und T3 bekannt. Im Fall von T5 war das Tier in den letzten 2 Monaten vor Entstehung des VAS mehrfach zwischen den Schulterblättern geimpft worden, während sich T5 links am Thorax entwickelte. Ob zuvor auch an dieser Lokalisation Impfungen oder andere Injektionen erfolgt waren, ist wegen Tierarztwechsel nicht bekannt. Bei den Tieren, von denen T1 und T4 stammten, ist über Impfungen oder sonstige Injektionen nichts bekannt, es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass solche durchgeführt worden waren.

### **5.1.2 FeLV-Status/Histologie/Immunhistologie**

Alle untersuchten Tumoren wurden sowohl immunhistologisch als auch mittels PCR negativ auf FeLV getestet. Damit konnten sowohl eine floride als auch eine latente FeLV-Infektion ausgeschlossen werden und T1-T5 aufgrund ihrer Lokalisation in Verbindung mit dem histologischen Erscheinungsbild und der immunhistologisch positiven Reaktion auf Vimentin eindeutig als VAS eingeordnet werden. Vereinzelt wird auch von VAS berichtet, die immunhistologisch eine positive Reaktion auf Desmin zeigen (Hendrick und Brooks, 1994; Madewell et al., 2001). Alle hier untersuchten VAS waren jedoch, wie auch die meisten VAS in der Literatur, negativ für Desmin.

Bei T1, T2, T4 und T5 handelte es sich histologisch eindeutig um Fibrosarkome, während in T3 zusätzlich Osteoid nachgewiesen werden konnte. Die Bezeichnung eines solchen Tumors ist in der Literatur nicht einheitlich: Nach der WHO wird ein Fibrosarkom, in dem Knochen von malignen Osteoblasten produziert wird, als Osteosarkom bezeichnet, unabhängig davon, ob es primär von einem Knochen ausgeht. Manche Autoren berichten vom Auftreten eines Osteosarkoms als VAS (Esplin et al., 1993; Hendrick und Brooks, 1994). Hendrick und Brooks (1994) klassifizieren auch solche VAS als Osteosarkome, in denen sich kleine Herde von neoplastischem Osteoid finden. Bei Bleier (2003) werden dagegen solche Tumoren als Fibrosarkome mit osteoiden Anteilen bezeichnet. Da es sich jedoch auf jeden Fall um VAS handelt und beide Bezeichnungen verständlich sind, kommt es auf eine Entscheidung nicht an. In dieser Arbeit wird T3, das keinen Knochen sondern nur Osteoid enthält, als Fibrosarkom mit osteoiden Anteilen eingeordnet.

Differentialdiagnostisch von Fibrosarkomen abzugrenzen sind maligne fibröse Histiozytome. Dabei handelt es sich nach der WHO um maligne Neoplasien mit variablem Zellbild, die vermutlich von primitiven mesenchymalen Zellen, die Anzeichen eines

fibroblastischen/myofibroblastischen Phänotyps zeigen, ausgehen. Bei Katzen können sie als Variante des VAS auftreten. Histologisch sind sie oft nicht von undifferenzierten Fibrosarkomen zu unterscheiden. Hendrick und Brooks (1994) nahmen eine morphologische Unterscheidung vor: Tumoren, in denen Spindelzellen vorherrschten, die in Bündeln angeordnet waren, wurden als Fibrosarkome bezeichnet, während solche Tumoren, in denen atypische histiozytäre Zellen überwogen und die Spindelzellen ungeordnet lagen, den malignen fibrösen Histiozytomen zugeordnet wurden. Pace et al. (1994) verwendeten dagegen immunhistologische Untersuchungen zur Abgrenzung; danach waren maligne fibröse Histiozytome der Katze im Gegensatz zu Fibrosarkomen positiv für Typ I und Typ II Zytokeratin. Da T1-T5 immunhistologisch negativ für Zytokeratin waren, wurden sie als Fibrosarkome klassifiziert.

Die Feststellung des **Differenzierungsgrades** nach Couto et al. (2002) ergab Grad I für T1, Grad II für T2 und Grad III für T3-T5. Damit wies die Mehrzahl der eigenen Fälle Grad III auf, während Couto et al. zu 25 % Grad I, zu 48 % Grad II und zu 27 % Grad III diagnostizierten. Romanelli et al. (2008) klassifizierten in ihrer Untersuchung von 57 VAS sogar nur 5 % als Grad III, dagegen 23 % als Grad II und 73 % als Grad I. Dieser Unterschied ist möglicherweise zufällig und im Zusammenhang mit der geringen eigenen Probenzahl zu sehen. Denkbar ist aber auch, dass sich schlecht differenzierte VAS besser in vitro anzüchten liessen und damit einen höheren Anteil der eigenen Proben stellten. Von den zunächst in Kultur genommenen 24 VAS konnten nur von 5 VAS permanente Zelllinien entwickelt werden, so dass eine Vorselektion der Proben erfolgt war. Ebenfalls einen hohen Anteil von Grad III-Tumoren fanden Guidice et al (2009): Sie klassifizierten von 48 untersuchten VAS 9 (19 %) als Grad I, 17 (35 %) als Grad II und 22 (46 %) als Grad III.

In T1 wurde keine **Nekrose** gefunden, bei T2 betrug der nekrotische Bereich weniger als 50 % der Tumorfläche und bei T3-5 mehr als 50 % der Tumorfläche. Damit nahm der Nekroseanteil bei schlechterem Differenzierungsgrad zu. Es ist zu berücksichtigen, dass zur Feststellung des Differenzierungsgrades nach Couto der Nekroseanteil bereits herangezogen wird. Aber auch Bleier (2003) ermittelte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Nekrose und schlecht differenzierten VAS, wobei die Bestimmung der Differenzierung nur anhand des vorherrschenden Zelltyps erfolgte.

**Blutungen** waren nur in den schlechter differenzierten VAS zu erkennen. Ein entsprechender Zusammenhang wurde auch von Bleier (2003) gesehen und konnte statistisch signifikant belegt werden.

Der Anteil an **kollagenen Fasern** nahm bei T1-T5 mit schlechterem Differenzierungsgrad ab.

Die in die eigenen Untersuchungen eingegangenen VAS enthielten alle **mehrkernige Riesenzellen**. Dagegen wird in der Literatur ein Prozentsatz von 27 % (Bleier, 2003) bis 50 % (Couto et al., 2002) für das Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen angegeben. Eindeutig belegt ist ein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen und dem Differenzierungsgrad von VAS (Bleier, 2003; Couto et al., 2002). Ein entsprechender Zusammenhang wurde auch bei T1-T5 beobachtet: Das am besten differenzierte (Grad I) VAS T1 enthielt nur ganz vereinzelt mehrkernige Riesenzellen mit bis zu 3 Kernen. Das mäßig differenzierte VAS T2 (Grad II) enthielt wenige Riesenzellen mit bis zu 22 Kernen. Die schlecht differenzierten VAS T3-T5 (Grad III) enthielten dagegen zahlreiche Riesenzellen mit bis zu 130 Kernen. Damit nahm bei den eigenen Fällen die Zahl der Riesenzellen und Anzahl der Kerne mit schlechterem Differenzierungsgrad der VAS zu. Couto et al. (2002) konnten in keinem der gut differenzierten VAS (Grad I) mehrkernige Riesenzellen nachweisen.

Ob es sich bei den Riesenzellen in VAS um neoplastische Riesenzellen oder um reaktive Riesenzellen und damit um spezielle Makrophagen handelt, ist noch nicht geklärt. Couto et al. (2002) klassifizierten die mehrkernigen Riesenzellen als neoplastisch, reaktiv oder unklaren Ursprungs. Als neoplastisch galten nach vorher beschriebenen Kriterien (Josten und Rudolph, 1997; Rosai, 1990) solche Riesenzellen, die teilungsaktiv sind und damit eine Immunreaktivität für den Proliferationsmarker Ki-67, nicht jedoch eine Immunreaktivität für den Makrophagenmarker CD18 aufweisen. Die oben genannten Prozentzahlen zum Vorkommen von Riesenzellen beziehen sich auf solche, die als neoplastisch klassifiziert worden waren. Ob Couto et al. (2002) auch andere mehrkernige Riesenzellen fanden, ist nicht beschrieben. Bleier (2003) ordnete dagegen die Riesenzellen in VAS als reaktiv ein, da sich in ihren Untersuchungen alle Riesenzellen als TRAP („tartrate resistant acid phosphatase“)-positiv darstellten. Bei TRAP handelt es sich um das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase, das konstant in Osteoklasten und osteoklastenähnlichen Riesenzellen sowie deren einkernigen Vorstufen vorkommt (Schäfer und Fischer, 1977). Auch waren in den Untersuchungen von Bleier (2003) alle mehrkernigen Riesenzellen positiv für CD18, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Couto et al. (2002) steht. Nicht zu der Einordnung als reaktive Riesenzellen passt dagegen die von Bleier (2003) gemachte Beobachtung, dass die Riesenzellen in den untersuchten VAS auch PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-positiv waren. PCNA ist ebenfalls ein Proliferationsmarker und soll bessere Ergebnisse in Bezug auf die Zellproliferation als Ki-67 erbringen (Sandusky et al., 1993), weshalb er von Bleier statt Ki-67 verwendet wurde. Bei der Einordnung als reaktive Riesenzelle wird davon

ausgegangen, dass eine Fusion von Zellen des mononukleären Phagozytosesystems stattgefunden hat; deren Zellkerne besitzen keine Teilungsaktivität mehr und es lassen sich deshalb keine Proliferationsmarker darstellen (Roessner et al., 1987; Roessner et al., 1989).

In den eigenen Untersuchungen waren die wenigen Riesenzellen von T1 durchweg TRAP-negativ. In T2-T5 wurden dagegen sowohl TRAP-positive als auch TRAP-negative Riesenzellen gefunden, was im Widerspruch zu den von Bleier (2003) gemachten Beobachtungen steht. Auf die Expression eines Proliferationsmarkers wurden T1-T5 nicht untersucht. Die Tatsache, dass bei eigenen Untersuchungen sowohl TRAP-positive als auch TRAP-negative Riesenzellen gefunden wurden, könnte dafür sprechen, dass es vielleicht verschiedene Typen von Riesenzellen in ein und demselben VAS gibt. Der in der Literatur beschriebene häufige Nachweis von Proliferationsmarkern spricht dafür, dass es zumindest auch neoplastische Riesenzellen in VAS gibt. Dazu passen auch die eigenen Beobachtungen, dass TRAP-negative Riesenzellen existieren. Das Vorhandensein von TRAP-positiven Riesenzellen spricht dagegen für reaktive Riesenzellen. In der Literatur werden meist nur zwei Möglichkeiten für die Entstehung von Riesenzellen angegeben: Kernteilung in neoplastischen Zellen oder Fusion von Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (Josten und Rudolph, 1997). Selten in Erwägung gezogen wird, dass auch eine Fusion von Tumorzellen stattfinden könnte. Mighell et al. (1996) zogen in Betracht, dass die Riesenzellen in einem Fibrom durch Fusion von Fibroblasten entstanden sein könnten, konnten diese Vermutung aber nicht bestätigen. Nach eigener Erfahrung gab es mehrere VAS, aus denen keine permanenten Zelllinien gewonnen werden konnten. In einigen dieser Fälle kam es in Kultur erst zum Anwachsen von Tumorzellen; nach ca. zwei Wochen wurden plötzlich Riesenzellen mit bis zu 60 Kernen gesehen, die aus den angewachsenen Tumorzellen durch Fusion entstanden zu sein schienen. Es war zu erkennen, wie sich die Zellen nebeneinander legten und es zu einem Verlust der Zellgrenzen kam. Die so in Kultur entstandenen Riesenzellen starben nach ein bis zwei Tagen ab: Sie kugelten sich ab und schwammen im Medium. Es bleibt die Frage, ob die Zellen auch in der Lage sind, sich in vivo ebenfalls so zu verhalten oder ob es sich nur um eine Reaktion auf die Inkulturnahme gehandelt hat. Da diese Riesenzellen in Kultur alle starben, bestand nicht die Möglichkeit, sie immunzytologisch und enzymzytochemisch zu untersuchen. Zu einem solchen Verhalten in vivo würde auch passen, dass mehrkernige Riesenzellen häufig am Nekroserand gefunden werden. Bis jetzt wurde das immer als Hinweis für die Phagozytoseaktivität der Riesenzellen interpretiert. Diese Riesenzellbildung in Kultur wurde allerdings nicht immer beobachtet: Sie fehlte bei L1-L5, obwohl die meisten entsprechenden Primärtumoren auch vielkernige, teilweise am

Nekroserand gelegene Riesenzellen besaßen. Ebenfalls nicht beobachtet wurde diese Riesenzellbildung bei den Zellen, die zur Kontrolle aus Unterhautgewebe angezüchtet wurden. Die Kontrollzellen konnten nicht dauerhaft in Kultur gehalten werden und starben in Passage 3 oder 4 ab, ohne zuvor solche Riesenzellen gebildet zu haben.

T1-T5 wiesen deutliche, überwiegend in der Peripherie angeordnete **entzündliche Infiltrate** auf. Histologisch beschrieben sowie selbst gefunden wurden überwiegend Lymphozyten und auch Makrophagen, aber auch Plasmazellen und neutrophile Granulozyten. Eine immunhistologische Untersuchung der Entzündungszellen wurde nicht vorgenommen, da es bereits mehrere entsprechende Untersuchungen gibt (Couto et al., 2002; Bleier, 2003). Bei den nodulär in der Tumorperipherie angeordneten Lymphozyten handelt es sich überwiegend um B-Zellen, während bei den infiltrierenden Lymphozyten T-Zellen vorherrschen (Bleier, 2003). Die genaue Bedeutung von Entzündungszellinfiltrationen in Tumoren im Allgemeinen und in VAS im Besonderen ist noch nicht geklärt. Auf den möglichen Zusammenhang zwischen Entzündungszellen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen und ihre mögliche Bedeutung wird weiter unten eingegangen.

Alle untersuchten VAS waren immunhistologisch positiv für  **$\alpha$ -SMA**: T1, T2, T3 und T5 zu 80-90 % und T4 zu ca. 30 % der Tumorzellen. Der Nachweis von  $\alpha$ -SMA in Verbindung mit Vimentin spricht für das Vorhandensein von Myofibroblasten. Myofibroblasten müssen nicht immer  $\alpha$ -SMA exprimieren; vielmehr kann unterschieden werden in solche, die kein  $\alpha$ -SMA exprimieren, von Serini und Gabbiani (1999) auch „Protomyofibroblasten“ genannt, und solche, die  $\alpha$ -SMA exprimieren, auch „differenzierte Myofibroblasten“ genannt. Powell et al. (1999) unterschieden V-Typ Myofibroblasten, die nur Vimentin exprimieren, von VD-Typ Myofibroblasten, die Vimentin und Desmin exprimieren, VAD-Typ Myofibroblasten, die Vimentin,  $\alpha$ -SMA und Desmin exprimieren, VA-Typ Myofibroblasten, die Vimentin und  $\alpha$ -SMA exprimieren und VM-Typ Myofibroblasten, die Vimentin und Myosin exprimieren. Sie sahen die Expression von  $\alpha$ -SMA als Zeichen von Aktivierung (Powell et al., 1999). Danach konnten in allen untersuchten VAS aktivierte oder differenzierte Myofibroblasten nachgewiesen werden.

In der Literatur existieren zahlreiche Berichte von VAS, die Myofibroblasten enthalten (Couto et al., 2002; Dubielzig et al., 1993; Hendrick und Brooks, 1994; Madewell et al., 2001). Madewell et al. (2001) entdeckten in drei von sieben immunhistologisch untersuchten VAS eine positive Reaktion auf  $\alpha$ -SMA. Es reagierten dann jeweils mehr als 50 % der Tumorzellen. Bei einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von 20 VAS fanden sie aber in 16 von 20 Tumoren myofibroblastische Strukturen in Form von dünnen,

zytoplasmatischen Myofilamenten, die in gestreckten Bündeln unregelmäßig dicht angeordnet waren und charakteristische „dense bodies“ formten (Madewell et al., 2001). Bei den sieben immunhistologisch untersuchten VAS handelte es sich um eine Auswahl der elektronenmikroskopisch untersuchten VAS. Es wurde für die Immunhistologie eine Vorauswahl von VAS mit und ohne Myofibroblasten getroffen, was die im Vergleich zu den elektronenmikroskopischen Ergebnissen geringe Anzahl der immunhistologisch positiven VAS erklären könnte. Es wird jedoch nicht genau beschrieben, welche elektronenmikroskopischen Befunde an den immunhistologisch untersuchten VAS erhoben worden waren. Möglicherweise handelte es sich in den Fällen, in denen eine Expression von  $\alpha$ -SMA nicht nachgewiesen werden konnte, auch um nicht aktivierte Myofibroblasten oder Protofibroblasten. Hendrick und Brooks (1994) fanden in vier von fünf immunhistologisch untersuchten VAS eine positive Reaktion für einen oder mehrere der Muskelmarker Desmin, Muskelspezifisches Aktin (HHF-35) oder  $\alpha$ -SMA, wobei die genaue Anzahl für die einzelnen Marker nicht genannt wird. Daher ist nicht eindeutig, in welchen Fällen aktivierte bzw. differenzierte Myofibroblasten oder auch nicht aktivierte VD-Typ Myofibroblasten vorhanden waren. Couto et al. (2002) wiesen in 28 von 44 VAS  $\alpha$ -SMA- positive Tumorzellen nach; bei 29 % der VAS mit Myofibroblasten waren die meisten Tumorzellen positiv, bei 32 % war etwa die Hälfte der Tumorzellen positiv und bei 29 % waren nur wenige positive Tumorzellen vorhanden. Bei 10 ebenfalls immunhistologisch auf  $\alpha$ -SMA untersuchte nicht-VAS zeigten dagegen nur 2 eine schwache Reaktion. Es traten mehrkernige RZ sowohl mit als auch ohne  $\alpha$ -SMA in VAS auf (Couto et al., 2002).

Im Gegensatz zu den oben angeführten Studien konnten bei eigenen Untersuchungen in allen VAS Myofibroblasten nachgewiesen werden. Der höhere Prozentsatz von 100 % ist eventuell im Zusammenhang mit der geringen Anzahl der untersuchten VAS zu sehen. Auf jeden Fall handelt es sich bei dem Vorkommen von Myofibroblasten in VAS um ein häufiges Phänomen. Auch in der Humanmedizin werden Myofibroblasten mit pathologischen Umständen in Verbindung gebracht wie z.B. hypertrophem Narbengewebe, Fibromatose oder Desmoplasie in Lungen- und Mammakarzinomen (Menzel und Fletcher, 1997; Roche, 1990; Skalli et al., 1989). Darüber hinaus spielen sie bei der Wundheilung eine Rolle: Es ist bekannt, dass Fibroblasten ca. 6 Tage nach Beibringung einer chirurgischen Wunde  $\alpha$ -SMA exprimieren. Unter normalen Umständen hält diese Expression etwa 30 Tage an und nimmt dann ab (Darby et al., 1990; Dubielzig et al., 1993). Rolle und Funktion von Myofibroblasten beim Tumorwachstum und insbesondere bei VAS ist noch nicht bekannt (Couto et al., 2002). Denkbar wäre, dass die Expression von  $\alpha$ -SMA aus unbekannten Gründen nach der Impfung

oder sonstigen Injektion in einigen Fällen nicht abnimmt und dass es dann zu einer Entartung der entsprechenden Zellen kommt. In den Studien, die sich mit Impfreaktionen von Katzen beschäftigten, wurde die Expression von  $\alpha$ -SMA nicht untersucht, so dass es keine Erkenntnisse diesbezüglich gibt. Couto et al. (2002) hielten für möglich, dass Myofibroblasten durch ihre Kontraktilität das Einwandern von Entzündungszellen in den Tumor weitgehend verhindern und deshalb für die charakteristische Entzündungszellinfiltration am Rand der VAS verantwortlich sind. Allerdings konnten sie keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Myofibroblasten und Entzündung feststellen. Denkbar ist auch, dass von den Entzündungszellen produzierte Wachstumsfaktoren die Differenzierung zu Myofibroblasten und deren Proliferation anregen.

Auf den Zusammenhang zwischen Myofibroblasten und Wachstumsfaktoren wird weiter unten genauer eingegangen.

In T1-T5 konnte eine **MHC II-Expression** durch neoplastische Zellen nachgewiesen werden. Bei der Katze exprimieren Lymphozyten und Monozyten MHC II (Rideout et al., 1990). Auch in Milz, Lymphknoten, Thymus und Peyerschen Platten kann MHC II nachgewiesen werden (Hunt et al., 1995). Während Fibroblasten in Lymphknoten, feline Plattenepithelkarzinomen (Perez et al., 1999a) und in Bereichen von Fibrose im Zusammenhang mit feline progressiver lymphozytischer Cholangitis (Day, 1998) MHC II exprimieren, sind Fibroblasten unveränderter Haut weitgehend MHC II negativ (Bleier, 2003). Ausschließlich MHC II-negative feline Fibroblasten und Fibrozyten in unveränderter Haut fand Frau M. Huisinga bei Untersuchungen im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur MHC II-Expression bei Dermatitis von Hund und Katze unter Verwendung desselben Antikörpers HLA-DR, wie er bei den eigenen Untersuchungen verwandt wurde (Huisinga, 2008). Bei Fibroblasten in Granulationsgewebe ergab sich kein einheitliches Bild: Das untersuchte Biopsiematerial umfasste Proben, in denen die Fibroblasten des Granulationsgewebes MHC II-positiv waren und solche, in denen sie negativ waren (Huisinga, 2008).

Die Expression von MHC II in Tumorzellen ist variabel. Bleier (2003) entdeckte in untersuchten 102 VAS zwischen 0 % und 80 % MHC II-positiv neoplastische Zellen. Dies stimmt mit den selbst ermittelten 5 %-80 % überein. Während Bleier (2003) keine statistische Signifikanz zwischen MHC II-Expression und Differenzierungsgrad feststellen konnte, fällt am eigenen Untersuchungsgut auf, dass die Anzahl der MHC II-positiven Zellen mit schlechterem Differenzierungsgrad abnahm: Bei T1 (Grad I) betrug die Anzahl der MHC II-

positiven Zellen ca. 80 %, bei T2 (Grad II) ca. 50 % und bei T3-T5 (Grad III) ca. 5 %-40 %. Einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen hoher MHC II-Expression durch Tumorzellen und gut differenzierten Tumoren ermittelten Pérez et al. (1999a) bei der Untersuchung von feline Plattenepithelkarzinomen. Über die Bedeutung der MHC II-Expression in VAS ist nichts Genaues bekannt. Für verschiedene andere Tumoren wie feline und equine Plattenepithelkarzinome (Perez et al., 1999a; Perez et al., 1999b), übertragbare venerische Tumoren des Hundes (Hsiao et al., 2002; Perez et al., 1998; Yang et al., 1987) und kanine benigne kutane Histiozytome (Kipar et al., 1998) wird vermutet, dass die Expression von MHC II eine lokale Anti-Tumor-Immunantwort auslöst, die das Tumorwachstum hemmt oder – wie im Fall des kaninen benignen kutanen Histiozytoms und des transmissiblen venerischen Tumors – sogar eine vollständige Regression bewirkt. Allerdings konnte in all diesen Fällen auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer starken Entzündungszellinfiltration und MHC II-Expression belegt werden. Ein solcher ist bisher in der Literatur für VAS nicht beschrieben. Auch die selbst untersuchten VAS gaben keinen Hinweis, darauf, dass ein solcher existieren könnte: Bei verschieden ausgeprägter MHC II-Expression waren T1-T5 alle stark entzündlich infiltriert. Die Bedeutung der MHC II-Expression durch VAS bleibt damit unklar und bedarf weiterer Klärung.

In den mehrkernigen Riesenzellen von T1-T5 konnte keine MHC II-Expression nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Bleier (2003) überein, die in den mehrkernigen Riesenzellen der von ihr untersuchten VAS ebenfalls keine MHC II-Expression feststellen konnte. Dieses Ergebnis hilft bei der Einordnung der mehrkernigen Riesenzellen nicht weiter, da weder alle VAS-Tumorzellen noch alle Makrophagen bei Katzen (Perez et al., 1999a) MHC II exprimieren. Daher kann weder der eine noch der andere Zelltyp als Ursprungszelle ausgeschlossen werden.

## **5.2 Zelllinien**

Von T1-T5 konnten die Zelllinien L1-L5 angezüchtet werden, die sich 4 bis 5,5 Jahre bis zum Abschluss der Untersuchungen (Oktober 2007) in den Passagen P231 (L1), P180 (L2), P170 (L3), P165 (L4) und P153 (L5) in Kultur befanden und danach kryokonserviert wurden. Damit handelt es sich um permanente Zelllinien. Die Zellen aller Linien zeigen deutliche Anzeichen für Malignität: Anisozytose, Anisokaryose, zahlreiche atypische Mitosen sowie Verlust der Kontaktinhibition. Die Zellpopulationen von L1-L4 bestehen vorwiegend aus lang gestreckten Zellen mit langen, fadenförmigen, z.T. verzweigten Ausläufern, die morphologisch den gut differenzierten Fibrosarkomzellen der Primärtumoren ähneln und auch



deren Wachstumsverhalten in einer Art Fischgrätmuster in mehreren, zueinander in spitzem Winkel gekreuzten Bündeln imitieren. Es fällt auf, dass dieses Wachstumsverhalten bei L1 und L2 am deutlichsten ausgeprägt ist. Dabei handelt es sich um die Zelllinien, die von einem gut (T1) und mittelmäßig (T2) differenzierten Primärtumor abstammen. Die Mehrzahl der Zellen von L5 ähnelt mit ihrer rundlichen, dreieckigen oder polygonalen Form eher undifferenzierten Fibrosarkomzellen. Damit bestehen morphologische Unterschiede der Linien, die von Primärtumoren Grad III abstammen: Obwohl alle Primärtumoren T3-T5 schlecht differenziert waren, bestehen L3 und L4 aus Zellen, die gut differenzierten Fibrosarkomzellen ähneln und L5 aus Zellen, die schlecht differenzierten Fibrosarkomzellen ähneln. Die Zellen von L5 haben große Ähnlichkeit mit den Zellen der Linie HT-1080, die von einem undifferenzierten humanen Sarkom abstammt (Rasheed et al., 1974). Eine allerdings nur geringgradige Kollagenbildung konnte mittels Spezialfärbung nur in L4 nachgewiesen werden. Dies ist erstaunlich, da es sich bei dem Primärtumor um ein schlecht differenziertes VAS Grad III handelt; es wäre eher zu erwarten gewesen, dass L1 oder L2, die von besser differenzierten VAS mit einem Faseranteil von mehr als 50 % abstammen, Kollagen bilden.

Immunhistologisch waren die Zellen aller Linien positiv für Vimentin sowie negativ für Desmin und Zytokeratin, so dass alle Zellen als mesenchymal identifiziert werden konnten.

Die Zahl der Zellen, die  $\alpha$ -SMA exprimierte, betrug bei allen Linien annähernd 100 %. Damit war die Expression in den Zelllinien höher als in den Primärtumoren. Es ist anzunehmen, dass dies entweder durch die Kulturbedingungen verursacht wurde oder durch die Selektion auf Zellen, die in der Lage sind, permanent in vitro zu wachsen. Die Expression von MHC II war dagegen in den Zelllinien herunterreguliert: Sie betrug bei L1 nur ca. 30 % im Vergleich zu T1 mit 80 % und war in L2-L5 nur vereinzelt nachweisbar, während sie in den Primärtumoren zwischen 5 % und 50 % betrug. Eine Expression von MHC II wird beim Menschen vor allem durch Interferon- $\gamma$  verursacht (Baudeau et al., 1994; Donnellan et al., 1995; Stemme et al., 1990); zu den Verhältnissen bei der Katze existieren keine speziellen Untersuchungen. Interferon- $\gamma$  wird vor allem von Entzündungszellen produziert, die in passagierten Kulturen nicht mehr vorhanden sind. Möglicherweise sind einige Tumorzellen in der Lage, Interferon- $\gamma$  zu produzieren, jedoch nicht in der Menge wie Entzündungszellen, was die vorhandene, aber im Vergleich zu den Primärtumoren geringere MHC II-Expression erklären könnte. Es wäre auch denkbar, dass noch ein anderer, bis jetzt unbekannter Stimulus für die Expression von MHC II existiert.

Bei der **Chromosomenanalyse** stellte sich heraus, dass bei allen Linien die mittlere Chromosomenzahl mit 46 bei L4, 47 bei L1 und L2, 62 bei L5 und 66 bei L3 deutlich über dem bei der Katze normalen Satz von  $2n = 38$  lag. Die Maxima lagen zwischen 60 bei L4 und 158 bei L5. Insgesamt variierte die Zahl der Chromosomen in allen Zelllinien sehr stark.

Ein einheitliches Auftreten von tri- oder polyploiden Zellen mit ungefähr gleicher Chromosomenzahl konnte nicht beobachtet werden. Ob es sich bei den stark variierenden Chromosomenzahlen von L1-L5 um einen Befund handelt, der auch für den jeweiligen Primärtumor repräsentativ ist, konnte nicht geklärt werden, da die Zelllinien ausschließlich in höheren Passagen untersucht wurden. Mayr et al. (1991) fanden bei verschiedenen Untersuchungen an Primärkulturen von feline Fibrosarkomen in einem Fall auch eine deutliche Variabilität der Chromosomenzahl, teilweise aber auch mit ca. 80 % einen recht hohen Prozentsatz an Zellen mit normalem Karyotyp, ohne allerdings Tumor-, Stroma- und Entzündungszellen differenziert zu haben (Mayr et al., 1996; Mayr et al., 1994). Bei den gefundenen Veränderungen handelte es sich vorwiegend um Translokationen (Mayr et al., 1996; Mayr et al., 1998b) oder Trisomien einzelner Chromosomen (Mayr et al., 1994), nicht jedoch um starke Schwankung und Vermehrung der Chromosomenzahl. Mayr et al. konnten ohne Differenzierung der Zellen nicht ausschließen, dass der hohe Prozentsatz an Zellen mit normalem Karyotyp durch kontaminierende stromale Zellen und/oder Entzündungszellen hervorgerufen wurde, die häufig zahlreich in Primärkulturen zu finden sind (Mayr et al., 1996; Mayr et al., 1998b). Thomas et al. (2009) fanden in ihrer Untersuchung von 46 Sarkomen, davon 19 VAS, hauptsächlich „Rearrangements“ und Verluste zahlreicher Genloci. Aufgrund der verwendeten Untersuchungsmethode der arraybasierten vergleichenden Hybridisierung konnten die Befunde nur für jeden Tumor insgesamt erhoben werden, Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen innerhalb eines Tumors konnten damit nicht erkannt werden. Die ebenfalls durchgeführte FISH an einer VAS-Zelllinie zeigte solche deutlichen Unterschiede zwischen einzelnen Zellen, allerdings wurden nur einige ausgewählte Genloci an 30 Zellen untersucht. Die Autoren nahmen an, dass es sich bei den Zellen, bei denen alle getesteten Loci mehrfach vorkamen, um mehrkernige Riesenzellen handelte. Die selbst untersuchten Zelllinien enthielten aber deutlich mehr Zellen mit erhöhter mittlerer Chromosomenzahl als mehrkernige Zellen in Kultur.

Aufschlussreich zur Klärung, ob die bei L1-L5 erhobenen Befunde deutlich erhöhter, mittlerer Chromosomenzahlen auf das Wachstum in vitro zurückzuführen sind, wäre ein Vergleich mit den Kontrollzellen gewesen, der aufgrund schlechten Wachstums und geringer Mitoserate aber nicht durchgeführt werden konnte.

Zusätzlich zu den Zellen, die mehr als 38 Chromosomen enthielten, wurden bei L1, L2, L3 und L4 auch in geringer Zahl Zellen gefunden, die eine Chromosomenanzahl unterhalb des diploiden Chromosomensatzes von 38 aufwiesen. Wie dieses Ergebnis einzuordnen ist, ist fraglich. In einer Arbeit (Hirsch, 1995) werden solche hypoploiden Zellen bei der Analyse von Primärkulturen feliner Fibrosarkome beschrieben. Darüber, ob solche Zellen tatsächlich lebensfähig sind, existieren keine Literaturangaben. Nicht auszuschließen ist jedenfalls, dass es sich um ein präparationsbedingtes Artefakt handeln könnte. Bei der Präparation werden die Zellen stark verdünnt und die Chromosomen durch Ausspreiten vereinzelt. Während die Chromosomen, die dicht beieinander liegen, in der Regel aus einer Metaphase stammen, ist nicht sicher, dass sie vollständig sind; es kann durch das Ausspreiten auch zum Abschwimmen und damit zum Verlust einzelner Chromosomen kommen.

Eindeutig ist jedenfalls festzustellen, dass bei allen Linien die Mehrzahl der Zellen mehr als 38 Chromosomen aufwies und starke Variationen vorlagen.

L2 war zusätzlich durch ein Markerchromosom gekennzeichnet: Es wurde in fast jeder untersuchten Zelle ein Chromosom A1 mit einer achromatischen Region gefunden (s. Abbildung 28). Ebenfalls ein Markerchromosom entdeckten Mayr et al. (1996) in einem VAS: Dort handelte es sich um ein verlängertes Chromosom F1, das häufig zusätzlich zu zwei normalen Chromosomen F1 auftrat. Die Herkunft dieses zusätzlichen Materials konnte nicht geklärt werden. Das seltene Auftreten von Markerchromosomen in VAS spricht dafür, dass es sich nicht um eine VAS-typische Veränderung handelt.

### **5.3 Kontrollen**

Zur Bestimmung der Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in VAS und Zelllinien wurde ein Kalibrator zum Vergleich benötigt, um die komparative C<sub>T</sub>-Methode anwenden zu können.

Als Kalibrator für die VAS wurde Unterhautgewebe von frishtoten Katzen verwendet, die in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität zur Sektion gelangten. Es wäre günstig gewesen, unveränderte Unterhaut der Katzen zu verwenden, von denen T1-T5 stammten. Bei diesen Tieren handelte es sich jedoch um Patienten, die zu einer kurativen Behandlung in Tierarztpraxen vorgestellt wurden und denen nur so viel Gewebe entnommen werden konnte, wie es therapeutisch notwendig war. Daher musste auf die Unterhaut anderer Tiere zurückgegriffen werden. Um möglichst repräsentative Werte zu erhalten und der Tatsache Rechnung zu tragen, dass es eventuell größere Unterschiede bei der Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch einzelne Tiere gibt, wurde Unterhautgewebe

von drei verschiedenen Tieren verwendet. Die Transkription wurde für jede Probe gesondert bestimmt und für weitere Berechnungen wurde der Mittelwert gebildet. Ein solches Vorgehen erschien sinnvoll, da bereits ein unterschiedliches Muster der Zytokintranskription in Blutmonozyten bei verschiedenen Katzen nachgewiesen wurde (Kipar et al., 2001). Das Durchschnittsalter der drei Katzen entsprach ungefähr dem der Katzen mit T1-T5 und es wurden die Lokalisationen seitlicher Thorax und interskapular ausgewählt, um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Aus dem Unterhautgewebe im Bereich seitlicher Thorax und interskapular wurden Zellen als Kalibrator für L1-L5 angezüchtet. Diese Zellen bildeten keine stabilen Linien und konnten nicht dauerhaft in Kultur gehalten werden. Daher mussten sie in der ersten Passage (P1) verwendet werden. Die Werte der Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription wurden wie beim Unterhautgewebe für jede Probe getrennt bestimmt und dann wurde für weitere Berechnungen der Mittelwert gebildet. Die morphologischen und immunzytologischen Untersuchungen wurden an Sammelproben durchgeführt, da die Zellen verschiedener Tiere morphologisch keine erkennbaren Unterschiede aufwiesen. Die Verwendung von Zellen aus P1 stellt einen großen Unterschied zu den Zellen von L1-L5 dar, die in höheren Passagen untersucht wurden. Dies war jedoch nicht anders möglich, da die Kontrollzellen nicht dauerhaft in Kultur gehalten werden konnten sondern spätestens in P3 abstarben.

Die Zellen wiesen die Morphologie von Fibroblasten auf: Sie waren von langgestreckter Form mit langen, fadenförmigen Ausläufern und besaßen in der Regel einen Zellkern. Vereinzelt konnten auch Zellen mit zwei Kernen gefunden werden. Definitionsgemäß handelt es sich dabei um mehrkernige Riesenzellen, jedoch waren die zweikernigen Zellen nicht oder kaum größer als die anderen Zellen und es fehlten die bei L1-L5 vorhandenen, mehrkernigen, deutlich größeren Riesenzellen mit bis zu 11 Kernen. Ein Verlust der Kontaktinhibition konnte nicht festgestellt werden.

Immunzytologisch stellten sich alle Zellen als Vimentin-positiv und Desmin- sowie Zytokeratin-negativ dar. Damit handelte es sich durchweg um mesenchymale Zellen, eine Kontamination mit Epithelzellen konnte ausgeschlossen werden. Alle Zellen waren  $\alpha$ -SMA-positiv. Dies legt nahe, dass es sich bei der starken Expression von  $\alpha$ -SMA, die in unveränderter Haut nicht vorkommt, aber auch in L1-L5 stärker als in T1-T5 beobachtet wurde, um eine Reaktion auf Kulturbedingungen handelt. Auf den Zusammenhang zwischen TGF $\beta$ 1 und der Expression von  $\alpha$ -SMA wird weiter unten eingegangen. Auf jeden Fall scheinen sich Fibroblasten zu Myofibroblasten transdifferenzieren zu können. Damit sind

Fibroblasten, möglicherweise neben anderen Zelltypen, Ursprungszellen von Myofibroblasten.

Mit ca. 30 % MHC II-positiven Zellen war ihre Zahl gleich hoch bzw. höher als bei L1-L5. Da Fibroblasten nicht konstitutiv MHC II exprimieren sondern dazu stimuliert werden müssen, scheint ein solcher Stimulus unter Kulturbedingungen vorhanden zu sein.

Mittels Spezialfärbung konnte eine deutliche Kollagenfaserbildung nachgewiesen werden, die wesentlich stärker war als die von L4 gezeigte Kollagenfaserbildung.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass es sich bei den Zellen um mesenchymale Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten handelte, die vereinzelt zweikernig waren, Kollagen produzierten und  $\alpha$ -SMA exprimierten. Damit waren sie als Kontrollzellen geeignet.

## **5.4 Untersuchung auf die Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen**

### **5.4.1 Anwendung der komparativen C<sub>T</sub>-Methode mit GAPDH als „housekeeping“ Gen**

Zur Quantifizierung der Transkription von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in VAS und Zelllinien wurde die komparative C<sub>T</sub>-Methode (User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems; Weiterstadt) verwendet. Nach dieser wird die Wachstumsfaktor- und Zytokin-Transkription, normalisiert gegen eine endogene Kontrolle, als relative Transkription zu der des gewählten Kalibrators angegeben. Als endogene Kontrolle diente das „housekeeping“ Gen GAPDH, als Kalibrator wurde feline Unterhaut für T1-T5 und daraus gezüchtete Zellen für L1-L5 verwendet. Damit ist das Ergebnis kein absoluter Wert, sondern es gibt das Verhältnis der Transkription der Zielproben zu einer Kontrollprobe (Kalibrator) an. Da die absolute Transkriptionsmenge sehr gering ist, fällt es durch den Vergleich mit einer Kontrollprobe leichter, Unterschiede zu erkennen und zu bewerten, als bei Betrachtung der absoluten Werte.

Im Gegensatz zur Standardkurvenmethode bietet die Normalisierung gegen eine endogene Kontrolle den Vorteil, dass nicht im selben Lauf eine Standardkurve mitbestimmt werden muss. Dadurch können in einem Lauf mehr Proben getestet werden, weil kein Platz für Proben, mit denen eine Standardkurve erstellt werden soll, benötigt wird. Außerdem wird einer falschen Beurteilung vorgebeugt, die stattfinden könnte, wenn bei der Herstellung der Proben für die Standardkurve Verdünnungsfehler gemacht werden (User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems; Weiterstadt).

Die Effizienz aller Systeme lag zwischen 90 % und 100 %, so dass die Methode verwendbar ist und die Ergebnisse vergleichbar sind (Liu und Saint, 2002; Livak und Schmittgen, 2001).

In dieser Studie wurde als endogene Kontrolle bzw. „housekeeping“ Gen GAPDH verwendet. Die Normalisierung gegen eine endogene Kontrolle ist nötig, um eine unterschiedliche Menge mRNS, die in die RT-Reaktion eingesetzt wurde (Livak und Schmittgen, 2001), und die Unterschiede der Effizienz der RT-Reaktionen (Kipar et al., 2001) auszugleichen. Es eignen sich solche Gene, die in allen kernhaltigen Zellen vorkommen und möglichst konstant exprimiert werden, da sie für das Überleben der Zellen notwendig sind (Pfaffl, 2001). Dies ist bei GAPDH, einem Enzym der Glykolyse, der Fall (Glare et al., 2002). Zunächst wurde angenommen, dass die mRNS-Synthese dieser Gene in verschiedenen Geweben, auch unter experimentellen Bedingungen, stabil bleibt (Foss et al., 1998; Thellin et al., 1999). Inzwischen existieren einige Studien, die zeigen, dass die Expression von „housekeeping“ Genen reguliert wird und unter verschiedenen Bedingungen variieren kann (Chambers, 2002; Glare et al., 2002; Haller et al., 2004; Pfaffl, 2001; Radonic et al., 2004). Speziell für humane und murine GAPDH wurde nachgewiesen, dass ein Zusammenhang zwischen dem mRNS-Gehalt und der Zellproliferation besteht: Es findet eine schnelle Hochregulierung der Transkription bei Einwirkung von mitogenen Stimuli wie EGF, TGF $\beta$  und PDGF statt (Coffey et al., 1988; Glare et al., 2002). Im Zusammenhang mit Tumoren wurde eine Hochregulierung der Transkription von GAPDH in der Milz von Mäusen, denen Tumoren implantiert worden waren (Aledo et al., 1999; Coffey et al., 1988), in Hepatomgewebe von Ratten (Chang et al., 1998) sowie in humanem Mammakarzinomgewebe (Lu et al., 2002) und humanen Zervixtumoren (Kim et al., 1998) gefunden. Eine Hochregulierung wurde ebenfalls bei hypoxischen Zuständen, wie sie auch in Tumoren häufig vorkommen, beschrieben (Lu et al., 2002).

Dennoch wurde auch in aktuelleren Studien, die sich mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und/oder Tumoren beschäftigen, GAPDH als „housekeeping“ Gen verwendet, so für die Bestimmung des Survivin-Transkriptionslevels bei humanen Sarkompatienten (Kappler et al., 2001), bei der Messung der Zytokin-mRNS- Expression in Darmbiopsien von Katzen mit entzündlicher Enteropathie (Nguyen Van et al., 2006), bei der Bestimmung der Zytokintranskription in Monozyten von Katzen (Kipar et al., 2005; Kipar et al., 2001) und Pumas (Sondgeroth et al., 2005) sowie bei der Bestimmung der Zytokintranskription an Impfstellen von Katzen (Carroll, 2003 ).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls GAPDH als „housekeeping“ Gen verwendet, denn ohne „housekeeping“ Gen wäre die Kontrolle der Qualität der mRNS und der Effizienz der RT-

Reaktion schwierig (Glare et al., 2002). Außerdem war GAPDH bereits mehrfach in Studien zur Zytokintranskription bei der Katze verwendet worden (Kipar et al., 2005; Nguyen Van et al., 2006), ein entsprechendes Primer-Sonden-System zur Durchführung der Realtime-PCR stand bereits zur Verfügung (Kipar et al., 2001) und Studien, die eine variable Transkription von feliner GAPDH belegen, waren bis zum Abschluss der eigenen Versuche in der Literatur nicht beschrieben.

Inzwischen (Stand: Januar 2010) wurde eine Studie veröffentlicht, in der die Transkriptionsstabilität verschiedener, potentieller „housekeeping“ Gene an verschiedenen feline neoplastischen und gesunden Geweben getestet worden war (Kessler et al., 2009). Dabei zeigte sich, dass GAPDH nicht in allen Geweben konstant transkribiert wurde. Bei Vergleich der Transkription in neoplastischen Geweben und der Transkription in den entsprechenden gesunden Geweben konnte jedoch kein besonderer Unterschied festgestellt werden. Unter den getesteten Geweben befanden sich allerdings keine Unterhaut und keine Hauttumoren, so dass kein eindeutiger Rückschluss auf die Transkription von GAPDH in dieser Untersuchung möglich ist. Es ist daher zu berücksichtigen, dass die Transkription von GAPDH in dieser Untersuchung möglicherweise nicht konstant erfolgte.

Die oben genannten Studien zu humaner und muriner GAPDH lassen vermuten, dass es sich, falls eine Änderung der Transkription von GAPDH in VAS stattfindet, um eine Hochregulierung handelt.

Einen Hinweis darauf, ob eine Hochregulierung der Transkription von GAPDH in den VAS und Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen stattgefunden hat, geben die gemessenen C<sub>T</sub>-Werte (vgl. Tabelle 8.2). Ein direkter Vergleich der Werte von VAS und Kontrollgewebe ist nicht möglich, da zwar für jede Extraktion die gleiche Menge an Gewebe eingesetzt wurde, jedoch die Tumoren zellreicher waren als die Kontrollgewebe (Unterhaut). Damit war die aus T1-T5 extrahierte RNS-Menge größer als die aus KHA-C extrahierte. Ebenso bleibt eine mögliche unterschiedliche Effizienz der RT-Reaktionen, die durch die Verwendung eines „housekeeping“ Gens gerade normalisiert werden soll, unberücksichtigt. Die jeweils relativ dicht beieinanderliegenden Werte aller VAS bzw. KH sprechen jedoch dafür, dass letztere nicht besonders ins Gewicht fällt.

Bei dieser Untersuchung betrugen die GAPDH-Werte für T1-T5 im Mittel 22,92 und für KHA-C 24,59. Bei der Differenz von 1,67 ergibt sich rechnerisch eine Transkriptionserhöhung von GAPDH in den VAS um den Faktor 3,18.

Beim Vergleich der GAPDH-Werte der Zelllinien mit den Kontrollzellen bleiben ebenfalls die möglicherweise unterschiedlichen Effizienzen der RNS-Extraktionen und RT-Reaktionen

unberücksichtigt, aber auch hier sprechend die jeweils relativ dicht beieinanderliegenden Werte aller Zelllinien bzw. KHZ dafür, dass keine großen Unterschiede bestanden. Für die Extraktion wurde von Zelllinien und Kontrollzellen jeweils ungefähr die gleiche Menge an Zellen verwendet, so dass eine eventuell größere RNS-Menge der Zelllinien Folge einer erhöhten Transkription und nicht einer größeren Zellzahl der Probe wäre. Damit sind die GAPDH-C<sub>T</sub>-Werte der Zellen besser vergleichbar als die der VAS mit Kontrollgewebe.

Bei dieser Untersuchung betrugen die GAPDH-Werte für L1-L5 im Mittel 24,69 und für KZA-C 25,45. Bei der Differenz von 0,76 ergibt sich rechnerisch eine Transkriptionserhöhung von GAPDH in den Zelllinien um den Faktor 1,69.

Die gemessenen GAPDH-Werte weisen damit auf eine leichte Erhöhung der Transkription von GAPDH der Tumoren und Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen hin, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt wird. Der höhere Faktor bei den Tumoren ist zumindest auch auf die höhere Zellzahl im Vergleich zum Kontrollgewebe zurückzuführen.

#### **5.4.2 Transkription von EGF, FGF-2, PDGF, TGF $\beta$ 1, TNF und IL-1 in VAS, Zelllinien und Kontrollen**

Insgesamt fällt auf, dass die Werte der relativen Transkription von Tumoren und Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen bis auf zwei „Ausreißer“ (EGF-Transkription von T1, PDGF-Transkription von L2) relativ dicht beieinanderlagen. Im Gegensatz dazu beschreiben andere Autoren eine deutliche Variabilität der Zytokintranskription bei verschiedenen Katzen (Carroll, 2003 ; Kipar, 2002; Kipar et al., 2001). Entsprechende Werte wurden an Gewebe von drei Wochen alten Impfstellen bzw. kurzzeitkultivierten Blutmonozyten erhoben. Diese Unterschiede in der Zytokintranskription bei verschiedenen Katzen könnten eine Ursache dafür sein, dass nur ein geringer Prozentsatz von Katzen, die geimpft wurden oder die einem anderen Entzündungsreiz ausgesetzt wurden, ein VAS entwickeln. Möglicherweise prädisponiert ein bestimmtes Transkriptionsmuster, bei dem es schneller zur Dysregulation und Imbalance von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen kommt, zur Tumorentstehung. Um was für ein Transkriptionsmuster es sich handelt, bedarf weiterer Klärung.

Die Transkription von **EGF** erwies sich im Rahmen dieser Untersuchung bei T1-T5 im Vergleich zum Kontrollgewebe als insgesamt unverändert.

Da sogar eine mitogene Wirkung, festgestellt durch eine gesteigerte DNS-Synthese, von EGF auf VAS-Zelllinien und feline Fibroblasten bewiesen wurde (Carroll, 2003 ), könnte EGF am Wachstum von VAS beteiligt sein. Dambach et al. (1996) fanden mittels Immunhistologie in



VAS deutlich EGF-positive Tumorzellen; die Tumorzellen in nicht-VAS waren dagegen nur schwach positiv oder negativ. Dies könnte dafür sprechen, dass eine gewisse Hochregulierung von EGF stattgefunden hat. In den selbst untersuchten Proben konnten bis auf T3 überall EGF-mRNS nachgewiesen werden, was zum Ergebnis der Studie von Dambach et al. (1996) passt. Im Vergleich zum Kontrollgewebe wurde jedoch keine Transkriptionserhöhung gefunden.

Bei den Zelllinien und Kontrollzellen konnte nur in je einer Probe des Doppelansatzes von L3 und KZA überhaupt EGF-mRNS nachgewiesen werden. Dabei waren beide gemessenen C<sub>T</sub>-Werte größer als 35, d.h. es handelte sich um eine sehr geringe Menge mRNS. Dass sowohl in den Zelllinien als auch in den Kontrollzellen fast keine Transkription von EGF nachgewiesen wurde, könnte bedeuten, dass die Transkription, die in T1, T2, T4 und T5 gefunden wurde, nahezu ausschließlich durch die Entzündungszellen erfolgte. Da aber in der Studie von Dambach et al. (1996) die Tumorzellen selbst EGF-positiv waren, spricht dies eher dafür, dass nicht nur Entzündungszellen zur in vivo-Produktion beitragen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit mit der gewählten Methode keine Hochregulierung der EGF-Transkription im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden, die auf eine Bedeutung von EGF für das Wachstum von VAS hinweisen würde. Dass eine solche existiert, kann aber – gerade auch unter Berücksichtigung der Studie von Dambach et al. (1996) – auch nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise resultiert der Unterschied auch daher, dass bei den eigenen Untersuchungen nur die VAS untersucht wurden, die in Kultur „anzüchtbar“ waren.

Die Transkription von **FGF-2** erwies sich im Rahmen dieser Untersuchung bei T1-T5 im Vergleich zum Kontrollgewebe ebenfalls als im Median unverändert. FGF-2-mRNS konnte in allen Proben von T1-T5 nachgewiesen werden. Dies passt im Wesentlichen zu den Ergebnissen von Nieto et al. (2003), die in 78 % der von ihnen untersuchten Fibrosarkomen immunhistologisch FGF-2-positive Tumorzellen entdeckten. Nieto et al. (2003) untersuchten die Proteinexpression, während in der hier durchgeführten Untersuchung auf die Transkription von mRNS untersucht wurde. Eine Proteinexpression setzt eine Transkription von mRNS voraus, so dass die Ergebnisse vergleichbar sind.

In dieser Untersuchung konnte keine hochregulierte Transkription im Vergleich zum Kontrollgewebe nachgewiesen werden. Der von Nieto et al. (2003) gefundene, statistisch signifikante, negative Zusammenhang zwischen FGF-2-Expression und dem Alter der Tiere bezog sich nur auf die generelle Expression und nicht auf die Quantität und konnte bei den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden, da in allen Proben von T1-T5 eine

Transkription beobachtet wurde. Die im Verhältnis größte Transkription fand in T2 statt, der von einer 6-jährigen Katze stammt. Die im Verhältnis geringste Transkription wies T1 von einer 11-jährigen Katze auf, so dass auch ein quantitativer Zusammenhang zwischen Alter und Transkription vorhanden sein könnte. Dazu passen allerdings nicht die im Verhältnis mittlere Transkription von T3 und T4, die von einer 12,5 Jahre bzw. 8 Jahre alte Katze stammen. Nieto et al. (2003) fanden einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhter FGF-2 Expression und Nekrose, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Von den eigenen Fällen zeigte T1, das einzige VAS ohne Nekrose, die geringste Transkription. Jedoch war die Transkription in T2 und T5 mit einem Nekroseanteil  $< 50\%$  höher als die in T3 und T4 mit einem Nekroseanteil von  $> 50\%$ .

In allen Zelllinien und Kontrollzellen konnte eine Transkription von FGF-2 nachgewiesen werden. Diese war bei den Zelllinien aber im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert. Möglicherweise liegt es daran, dass es sich bei den Kontrollzellen, wie Morphologie und stärkere Kollagenproduktion zeigen, um besser differenzierte Zellen handelt.

Die Berechnung des Verhältnisses der Transkription von T1-T5 im Vergleich zu der von L1-L5 ergibt, dass sie ungefähr gleich sind. Dies legt nahe, dass die Transkription von FGF-2 zumindest fast ausschließlich durch die Tumorzellen und nicht durch die Entzündungszellen erfolgt. Dazu passt auch, dass Nieto et al. (2003) keine Expression von FGF-2 in tumorinfiltrierenden Lymphozyten feststellen konnten.

Die Bedeutung von **PDGF** für die Angiogenese und seine Wirkung als wichtigstes Mitogen für Myofibroblasten lassen eigentlich vermuten, dass es in VAS stark transkribiert werden würde. Dies konnte in den eigenen Versuchen nicht bestätigt werden: Die Transkription von PDGF war im Rahmen dieser Untersuchung bei T1-T5 im Vergleich zum Kontrollgewebe erniedrigt. Die erwartete Hochregulierung von PDGF-mRNS und damit eine besondere Bedeutung dieses Wachstumsfaktors für VAS konnte nicht nachgewiesen werden.

Auch in den Zelllinien wurde in Relation zu den Kontrollzellen eine verminderte Transkription von PDGF gefunden.

Im Vergleich zu den Zelllinien transkribierten die Tumoren deutlich mehr PDGF. Dies spricht dafür, dass die Entzündungszellen zu einem großen Teil an der Transkription beteiligt sind, was auch zu den Ergebnissen von Dambach et al. (1996), die in VAS-Tumorzellen und tumorinfiltrierenden Lymphozyten PDGF nachwiesen, und Hendrick (1998a), die PDGF in tumorinfiltrierenden Lymphozyten nachwies, passt.

Denkbar ist, dass PDGF dennoch eine wichtige Rolle beim Wachstum von VAS spielt. Eine solche würde dann nicht durch eine hochregulierte Transkription und daraus folgender

erhöhter Expression dieses Wachstumsfaktors ermöglicht, sondern eventuell durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber PDGF, verursacht durch verstärkte Expression von PDGF-Rezeptoren. Eine solche wurde von Hendrick (1998a) in VAS nachgewiesen und ist auch für kultivierte Tumorzellen aus humanen Dermatofibrosarkomen, einem den VAS morphologisch und vom Wachstumsverhalten her ähnlichen Tumor, beschrieben (Kikuchi et al., 1993).

Die Transkription von **TGFβ1** erwies sich bei allen Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen als erhöht: Sie betrug in dieser Untersuchung ungefähr das 2- bis 5,7-fache. Die in dieser Untersuchung nachgewiesene erhöhte Transkription von TGFβ1 in VAS sowie der immunhistologische Nachweis von TGFβ1 in VAS durch Dambach et al. (1996) und auch die Ergebnisse von Carroll (2003), die an Impfstellen bei verschiedenen Katzen nach Applikation verschiedener Impfstoffe eine erhöhte Transkription von TGFβ nachwies, legen eine Bedeutung von TGFβ1 sowohl bei der Entstehung als auch beim Wachstum von VAS nahe.

Die Tumorentstehung könnte durch die transformierende Wirkung, die TGFβ1 auf mesenchymale Zellen hat (de Larco und Todaro, 1978; Elliott und Blobe, 2005), gefördert werden. Von den untersuchten VAS wies T3 mit 31 Mitosen/HPF ungefähr doppelt bis dreimal so viele Mitosen auf wie T1, T2, T4 und T5 mit 11 bis 16 Mitosen/HPF. Bei T3 wurde auch die höchste Transkription von TGFβ1 festgestellt, was auf einen Zusammenhang hindeuten könnte. TGFβ1 fördert das Wachstum von mesenchymalen Zellen unter anderem durch die Erhöhung der Produktion mitogener Wachstumsfaktoren wie PDGF (Seifert et al., 1994) und FGF-2 (Strutz et al., 2001). Eine Erhöhung der Transkription dieser Wachstumsfaktoren konnte in dieser Untersuchung jedoch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise besitzt TGFβ1 auch selbst direkte mitogene Wirkung auf VAS-Zellen. Weitere Wirkungen von TGFβ1 bestehen darin, bei Myofibroblasten die Synthese von α-SMA (Powell et al., 1999; Serini und Gabbiani, 1999) und einen aktivierten, zur Kollagensynthese befähigten Phänotyp zu induzieren (Border und Noble, 1994; Muchaneta Kubara und el Nahas, 1997). Bei T1-T5 wurden sowohl eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Transkription von TGFβ1 als auch α-SMA-positive Zellen und Kollagensynthese nachgewiesen. Ein Trend dahingehend, dass mit zunehmender Transkription von TGFβ1 auch mehr α-SMA-positive Zellen vorhanden waren oder mehr Kollagen produziert wurde, war allerdings nicht zu erkennen. Eine weitere Bedeutung von TGFβ1 in VAS könnte in seiner immunsuppressiven Wirkung liegen. Von TGFβ1 ist bekannt, dass er die zytotoxische Aktivität von TAM herabsetzt (Lewis und Pollard, 2006). Auch ist eine Blockade der

Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und damit die Verhinderung der IL-2 abhängigen Proliferation von T-Zellen beschrieben (Kehrl et al., 1986). TGF $\beta$ 1 verhindert auch die Differenzierung von T-Zellen zu Helferzellen oder zytotoxischen Zellen (Gorelik und Flavell, 2002). Weiterhin verhindert TGF $\beta$ 1 die Expression der zytolytischen Genprodukte Perforin, Granzym A und B, Fas-Ligand und Interferon- $\gamma$  durch zytotoxische T-Zellen (Thomas und Massague, 2005). Dies würde erklären, warum es bei VAS trotz der deutlichen entzündlichen Infiltrate in der Tumorperipherie nicht zu einer Spontanremission kommt: Die vor allem aus Lymphozyten und TAM bestehenden Infiltrate werden in ihrer immunologischen Funktion beeinträchtigt. Statt dessen wirken sie durch die Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren und Matrix Metalloproteinasen (Lu et al., 2006; Sica et al., 2002a) eher fördernd auf das Tumorwachstum.

In allen Zelllinien wurde ebenfalls eine Transkription von TGF $\beta$ 1 nachgewiesen, jedoch war die Transkription im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigt. Das erstaunliche Ergebnis, dass die besser differenzierten Kontrollzellen mehr TGF $\beta$ 1 produzierten als die transformierten Zellen von L1-L5, ist möglicherweise wieder darauf zurückzuführen, dass auch eine Hochregulierung der Transkription von GAPDH in L1-L5 stattgefunden hat. Eine Produktion von TGF $\beta$ 1 ist aber auch von anderen, nicht transformierten Fibroblasten wie Primärkulturen kaniner Unterhautzellen beschrieben (Fonfara, 2002; Gröne et al., 2002).

Beim Vergleich der Transkription von TGF $\beta$ 1 in T1-T5 im Vergleich zu L1-L5 zeigt sich, dass die Transkription in den Tumoren größer ist als in den Zelllinien in vitro. Dies spricht dafür, dass sowohl Entzündungszellen als auch Tumorzellen an der Transkription von TGF $\beta$ 1 beteiligt sind.

Die Transkription von **TNF** war in T1-T5 im Vergleich zum Kontrollgewebe deutlich erhöht: In dieser Untersuchung betrug sie das ca. 7- bis 147-fache.

TNF wirkt entzündungsfördernd durch seine Wirkung auf Gefäße: Kapillaren werden durch Verminderung der Zell-zu-Zell-Adhäsion undicht, vermehrte Oberflächenrezeptorexpression auf Endothelzellen ermöglicht Andocken und Auswandern von Leukozyten, die für weitere Gewebsschädigung sorgen (Mocellin et al., 2005). TNF wird als ein wichtiges Verbindungsmolekül zwischen Entzündung und Tumorentstehung gesehen (Lu et al., 2006). Daher ist es nicht erstaunlich, dass Carroll (2003) eine erhöhte Transkription von TNF in ihrer Untersuchung fand, bei der mehreren Katzen verschiedene Impfstoffe und andere entzündungsfördernde Substanzen verabreicht worden waren. TNF scheint bei der Entstehung von VAS eine wichtige Rolle zu spielen. Die eigenen Ergebnisse, die sich auf VAS im fortgeschrittenen Stadium beziehen, legen nahe, dass es auch für das weitere Wachstum von

VAS Bedeutung hat. In Bezug auf die Wirkung von TNF auf Tumoren wurden sowohl eine tumorhemmende als auch tumorfördernde Wirkung beschrieben. Eine wichtige Antitumorwirkung von TNF besteht in der selektiven Zerstörung von Gefäßen (Lejeune et al., 1998), was zu Gewebnekrosen führt. Bei T3 und T4, die mit mehr als 50 % der Gesamtfläche über den größten Nekroseanteil verfügten, war die Transkriptionserhöhung von TNF am geringsten. Die Transkriptionserhöhung in T1, dem einzigen der untersuchten VAS ohne Nekrose, lag dagegen im mittleren Bereich. Ein Trend, dass die VAS mit der größten Transkriptionserhöhung von TNF den größten Nekroseanteil aufwiesen, war damit nicht zu erkennen. Wenn in VAS eine tumorfördernde Wirkung von TNF vorherrscht, könnte ein Zusammenhang zwischen Transkriptionserhöhung und Mitoserate vorhanden sein. Bei den eigenen Untersuchungen zeigte T3 mit 31 die höchste Anzahl Mitosen pro HPF, aber die geringste Transkriptionserhöhung (7-fach). T5 zeigte mit 11 die geringste Anzahl Mitosen pro HPF die größte Transkriptionserhöhung (147-fach). Die Werte von T1, T2 und T4 lagen dazwischen. Eine mögliche tumorfördernde Wirkung von TNF scheint bei VAS nicht in einer direkt mitogenen Wirkung auf die Tumorzellen zu liegen, die eigenen Ergebnisse sprechen eher für einen umgekehrten Trend. Die deutliche Transkriptionserhöhung von TNF in dieser Untersuchung sowie auch die Ergebnisse von Carroll (2003) sprechen aber dennoch für eine besondere Bedeutung dieses Zytokins bei VAS. Eine Bedeutung von TNF könnte in der Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies und damit in einer transformationsfördernden Wirkung liegen. Ferner ist in Bezug auf humane und murine Fibroblasten bekannt, dass TNF die Kollagensynthese induziert (Gordon et al., 1992; Mauviel et al., 1991). T3 und T4 besaßen sowohl die geringste Transkriptionserhöhung von TNF als auch den geringsten Kollagengehalt. T1 und T2 wiesen eine größere Transkriptionserhöhung und einen höheren Kollagengehalt auf. Etwas aus der Reihe fällt T 5 mit einem mittleren Kollagengehalt aber der größten Transkriptionserhöhung von TNF. Damit könnte TNF einen Einfluss auf die Kollagensynthese in VAS haben.

Bei der Bewertung der oben untersuchten Beziehungen ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine geringe Probenzahl handelt. Daher kann lediglich anhand der Ergebnisse abgeschätzt werden, ob ein entsprechender Trend vorhanden ist, eine statistisch signifikante Aussage ist nicht möglich.

In L1-L5 wurden nur C<sub>T</sub>-Werte größer 38 oder sogar von 45 gemessen, was bedeutet, dass nur eine ganz geringe oder keine Transkription von TNF nachweisbar war. Ein Vergleich der Transkription in Tumoren und Zelllinien ergibt eine sehr viel stärkere Transkription in den Tumoren. Möglicherweise werden die Tumorzellen unter Kulturbedingungen nicht bzw.

kaum zur TNF-Transkription stimuliert. Naheliegender ist jedoch, dass die TNF-Transkripte in den Tumoren fast ausschließlich von den in den Zelllinien nicht vorhandenen Entzündungszellen produziert werden. Dies stimmt mit Literaturangaben überein, wonach die wichtigsten Produzenten für TNF aktivierte Makrophagen, Natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten sind (Mocellin et al., 2005). Die in den Kontrollzellen im Vergleich zu L1-L5 höhere Transkription von TNF könnte dadurch zu erklären sein, dass auch Fibroblasten (Mocellin et al., 2005) oder Myofibroblasten (Powell et al., 1999) TNF produzieren können, während dies für VAS-Tumorzellen nicht beschrieben ist.

Die größte Transkriptionserhöhung in den Tumoren im Vergleich zum Kontrollgewebe war bei **IL-1** festzustellen: In dieser Untersuchung betrug sie das ca. 69- bis 949-fache. Diese hohen Faktoren resultieren unter anderem daraus, dass in einem der drei Kontrollgewebe (KHA) keine Transkription von IL-1 nachgewiesen wurde und deshalb mit dem maximalen virtuellen  $C_T$ -Wert 45 gerechnet wurde. In der Literatur existierten bis zur Durchführung dieser Studie keine Untersuchungen zur Transkription oder Produktion von IL-1 in VAS; ein Vergleich mit anderen Ergebnissen ist daher nicht möglich. Da die Expression von IL-1 durch TNF induziert wird und in dieser Untersuchung ebenfalls eine deutliche Transkriptionserhöhung von TNF gefunden wurde, ist es nicht erstaunlich, dass auch die Transkription von IL-1 erhöht war. Es scheint auch ein gewisser Zusammenhang zu bestehen: T3 und T4 wiesen im Verhältnis die geringste Transkriptionserhöhung von TNF und IL-1 auf, die höchste Transkriptionserhöhung fand sich bei T2 und T5. Die deutliche Transkriptionserhöhung von IL-1 lässt vermuten, dass es für das Wachstum von VAS von Bedeutung ist. Ein Zusammenhang zur Transkriptionserhöhung von TNF scheint vorhanden zu sein. IL-1 stimuliert Tumorzellen zu Proliferation und Invasion und beeinflusst auch stromale Zellen. Die genaue Wirkungsweise ist noch unbekannt, es wird vor allem eine indirekte Wirkung vermutet (Lewis et al., 2006). Diese soll in einer Förderung der Angiogenese, verursacht durch die Hochregulierung des angiogenesefördernden „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), bestehen. Dessen Transkription wurde in dieser Arbeit nicht untersucht; möglicherweise handelt es sich bei VEGF um den für die Angiogenese in VAS bedeutsamsten Wachstumsfaktor. Das wäre eine Erklärung dafür, dass eine Transkriptionserhöhung der ebenfalls angiogenen Wachstumsfaktoren PDGF und FGF-2 nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wird durch IL-1 die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen gefördert, was sowohl Einsprossung von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese als auch die Invasion von Tumorzellen selbst fördert (Lewis et al., 2006).

In keiner untersuchten Zelllinie konnte eine Transkription von IL-1 nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die in den Primärtumoren vorhandenen Entzündungszellen die Haupt- oder sogar einzige Quelle der Produktion von IL-1 sind.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 5 feline Vakzinationsstellen-assoziierte Sarkome (VAS) sowie aus diesen gewonnene Zelllinien charakterisiert und auf die Transkription solcher Wachstumsfaktoren und Zytokine untersucht, die in Zusammenhang mit Entzündungen eine Rolle spielen. Es handelte sich um ein gut differenziertes VAS, ein mittelmäßig differenziertes VAS und drei schlecht differenzierte VAS, eins davon mit osteoiden Anteilen. Alle VAS enthielten  $\alpha$ -SMA-exprimierende Zellen sowie mehrkernige Riesenzellen. Bei den Riesenzellen gab es sowohl Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)-positive als auch TRAP-negative, was in Zusammenhang mit Literaturergebnissen zur Proliferationsaktivität vermuten lässt, dass verschiedene Typen von mehrkernigen Riesenzellen in VAS existieren: fusionierte Makrophagen sowie mehrkernige Tumorzellen, entstanden durch Zellfusion oder Endomitose. Von allen VAS konnten permanente Zelllinien etabliert werden, deren Charakteristika mit den Primärtumoren vergleichbar waren. Insgesamt war die Expression von MHC II in den Zelllinien vermindert. Alle Zelllinien enthielten mehrkernige Riesenzellen, deren Kernanzahl mit Ausnahme von L1 weit geringer war als die der Riesenzellen in den Primärtumoren. L1 enthielt Riesenzellen mit mehr Kernen als der Primärtumor T1. Alle Riesenzellen in Kultur waren TRAP-negativ, was dafür spricht, dass es sich um neoplastische Zellen handelte. Kollagenproduktion konnte nur in einer Linie nachgewiesen werden, die von einem schlecht differenzierten Primärtumor stammte. Nur eine der drei Linien, die von schlecht differenzierten VAS stammten, zeigte auch in Kultur ein eher undifferenziertes Erscheinungsbild, die anderen zeigten sowohl in Bezug auf die Zellmorphologie als auch auf das Wachstumsverhalten ein gut differenziertes Erscheinungsbild.

Die Chromosomenanalyse ergab eine breite Streuung: Es wurden sowohl eine Hypoploidie von 23 bis 36 Chromosomen als auch eine Hyperploidie von 60 bis 158 Chromosomen gefunden. Alle Linien wiesen eine durchschnittlich deutlich erhöhte Chromosomenzahl mit einem Median von 46 bis 62 Chromosomen auf. Es konnte keine spezielle Vervielfachung eines bestimmten Chromosoms oder des gesamten Chromosomensatzes beobachtet werden. L2 war durch ein Markerchromosom gekennzeichnet: Bei Chromosom 1 trat häufig eine achromatische Region auf. Die Bedeutung dieses Markerchromosoms bedarf weiterer Untersuchungen.

Für die Untersuchung der Transkription von EGF, FGF-2, PDGF, TGF $\beta$ 1, TNF und IL-1 wurde die komparative C<sub>T</sub>-Methode mit GAPDH als housekeeping Gen verwendet, da die Effizienzen aller Primer-Sonden-Systeme zwischen 90 % und 100 % betrugen. Mit dieser



Methode konnte keine Transkriptionserhöhung für EGF, FGF-2 und PDGF nachgewiesen werden. Eine deutliche Transkriptionserhöhung konnte dafür bei TGF $\beta$ 1, TNF und IL-1 festgestellt werden. TGF $\beta$ 1 schien sowohl von Tumorzellen selbst als auch von Entzündungszellen transkribiert zu werden. Die Bedeutung dieses Wachstumsfaktors für VAS könnten in seiner wachstumsfördernden Wirkung, der Induktion von  $\alpha$ -SMA und der immunsuppressiven Wirkung liegen. Demgegenüber scheinen TNF und IL-1 in VAS fast ausschließlich von Entzündungszellen und nicht von den Tumorzellen selbst transkribiert zu werden. Diese proinflammatorischen Zytokine können synergistisch eine Förderung von Wachstum, Angiogenese und Invasion bewirken. Dafür, dass TNF in VAS tumorsuppressive Wirkungen entfaltet, gab es keine Hinweise. Er scheint aber die Kollagenproduktion in VAS zu fördern.

## 6.1 Summary

In this study 5 feline vaccine-associated sarcomas (VAS) and their derived cell lines were characterized and investigated for transcription of growth factors and cytokines that play a role in the process of inflammation. The VAS comprised one well differentiated, one moderately differentiated and three poorly differentiated VAS; one of the latter containing isles of osteoid. All VAS displayed  $\alpha$ -SMA-producing cells as well as multinucleated giant cells. Multinucleated giant cells were either tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive or TRAP-negative. These results in combination with studies on proliferation activity described in literature lead to the conclusion that different types of multinucleated giant cells exist in VAS: fused macrophages and multinucleated tumor cells, formed by cell fusion or endomitosis.

Permanent cell lines displaying characteristics similar to those of the primary tumors, including expression of  $\alpha$ -SMA, could be established from all VAS. Expression of MHC II was reduced in cell lines compared with the tumors. All cell lines contained multinucleated giant cells with far less nuclei than those of the primary tumors except for L1; this cell line showed multinucleated giant cells containing more nuclei than the primary tumor. All giant cells in culture were TRAP-negative, which leads to the conclusion that their nature was neoplastic. Only one cell line produced collagen. This line was derived from a poorly differentiated primary tumor. Only one cell line originating from a poorly differentiated VAS also displayed undifferentiated growth in culture; the others appeared well differentiated in cell morphology as well as in cell growth.

Chromosomal analysis revealed a broad distribution: Hypoploidy ranging from 23 to 36 as well as hyperploidy from 60 to 158 were seen. All lines displayed chromosomal numbers above average with means between 46 and 62. No defined multiplication of a special chromosome or the complete chromosomal set was detected.

L2 was characterized by a marker chromosome: Chromosome 1 often showed an achromatic region. The importance of this finding needs to be further investigated.

To measure the transcription of EGF, FGF-2, PDGF, TGF $\beta$ 1, TNF and IL-1, the comparative C<sub>T</sub>-method with GAPDH as housekeeping gene was used, as the efficiency of all primer-probe-systems were between 90 % and 100 %. With this method, no increase of transcription was detected for EGF, FGF-2 and PDGF. An obvious increase was found in transcription of TGF $\beta$ 1, IL-1 and TNF. Apparently, TGF $\beta$ 1 was transcribed by tumor cells as well as by inflammatory cells. Its importance for VAS can lie in its ability to promote growth, induce the

production of  $\alpha$ -SMA and to suppress immunoreactions. In contrast to TGF $\beta$ 1 being produced in VAS by tumor cells and inflammatory cells, results indicate that IL-1 and TNF are almost solely transcribed by inflammatory cells. These inflammatory cytokines are able to promote growth, angiogenesis and invasion in a synergistic way. No evidence was found for a possible immunosuppressive effect of TNF in VAS. Actually, it seems to promote production of collagen in VAS.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdiu, A., Walz, T.M., Nishikawa, B.K., Wingren, S., Larsson, S.E., Wasteson, A., 1998, Human malignant fibrous histiocyctomas in vitro: growth characteristics and their association with expression of mRNA for platelet-derived growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptors. *Eur J Cancer* 34, 2094-2100.
- Abdiu, A., Wingren, S., Larsson, S.E., Wasteson, A., Walz, T.M., 1999, Effects of human platelet-derived growth factor-AB on sarcoma growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 141, 39-45.
- Abramsson, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., 2003, Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* 112, 1142-1151.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G., 2006, Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72, 1605-1621.
- Akhurst, R.J., Derynck, R., 2001, TGF-beta signaling in cancer - a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11, S44-S51.
- Alberdein, D., Munday, J.S., Dyer, C.B., Knight, C.G., French, A.F., Gibson, I.R., 2007, Comparison of the histology and immunohistochemistry of vaccination-site and non-vaccination-site sarcomas from cats in New Zealand. *N Z Vet J* 55, 203-207.
- Aledo, J.C., Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J., 1999, Upregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA in the spleen of tumor-bearing mice. *Biochimie* 81, 1109-1113.
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., Mantovani, A., 2008, The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66, 1-9.
- Allison, R.W., Lassen, E.D., Burkhard, M.J., Lappin, M.R., 2000, Effect of a bioflavonoid dietary supplement on acetaminophen-induced oxidative injury to feline erythrocytes. *J Am Vet Med Assoc* 217, 1157-1161.
- Apte, R.N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M.R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelm, Y., Voronov, E., 2006, The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* 25, 387-408.
- Arbiser, J.L., Byers, H.R., Cohen, C., Arbeit, J., 2000, Altered basic fibroblast growth factor expression in common epidermal neoplasms: examination with in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Am Acad Dermatol* 42, 973-977.
- Balkwill, F., 2002, Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 135-141.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Barka, T., Anderson, P.J., 1962, Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as a coupler. *J Histochem Cytochem* 10, 741-753.
- Basilico, C., Moscatelli, D., 1992, The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 59, 115-165.
- Battegay, E.J., Raines, E.W., Colbert, T., Ross, R., 1995, TNF-alpha stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *J Immunol* 154, 6040-6047.
- Baudeau, C., Delarue, F., He, C.J., Nguyen, G., Adida, C., Peraldi, M.N., Sraer, J.D., Rondeau, E., 1994, Induction of MHC class II molecules HLA-DR, -DP and -DQ and ICAM 1 in human podocytes by gamma-interferon. *Exp Nephrol* 2, 306-312.

- Baumgärtner, W.K., Krakowka, S., Koestner, A., Evermann, J., 1982, Acute encephalitis and hydrocephalus in dogs caused by canine parainfluenza virus. *Vet Pathol* 19, 79-92.
- Bell, R.S., Bell, D.F., Jacob, J., Trippel, S., Gebhardt, M.C., Mankin, H.J., 1989, Growth factor production by sarcoma cells in primary culture. *J Orthop Res* 7, 468-473.
- Ben Baruch, A., 2006, Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol* 16, 38-52.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B., 1997, Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18, 26-45.
- Bleier, T., 2003. Untersuchungen zu Einteilung und Pathogenese des feline Fibrosarkoms. Diss. Vet. Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Bockman, D.E., Sohal, G.S., 1998, A new source of cells contributing to the developing gastrointestinal tract demonstrated in chick embryos. *Gastroenterology* 114, 878-882.
- Border, W.A., Noble, N.A., 1994, Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331, 1286-1292.
- Buracco, P., Martano, M., Morello, E., Ratto, A., 2002, Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J* 163, 105-107.
- Carroll, E.E., 2003 Inflammatory cells and mediators in the pathogenesis of feline vaccine-associated sarcoma. Dissertation. University of Wisconsin-Madison, Madison.
- Chambers, R.C., 2002, Gene expression profiling: good housekeeping and a clean message. *Thorax* 57, 754-756.
- Chang, H.W., Ho, S.Y., Lo, H.F., Tu, Y.C., Jeng, C.R., Liu, C.H., Wang, F.I., Pang, V.F., 2006, Vaccine-associated rhabdomyosarcoma with spinal epidural invasion and pulmonary metastasis in a cat. *Vet Pathol* 43, 55-58.
- Chang, T.J., Juan, C.C., Yin, P.H., Chi, C.W., Tsay, H.J., 1998, Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 5, 469-471.
- Christopher, M., Broussard, J., Peterson, M., 1995, Heinz body formation associated with ketoacidosis in diabetic cats. *J Vet Intern Med* 9, 24-31.
- Coffey, R.J., Jr., Bascom, C.C., Sipes, N.J., Graves-Deal, R., Weissman, B.E., Moses, H.L., 1988, Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 8, 3088-3093.
- Coindre, J.M., Nguyen, B.B., Bonichon, F., de Mascarel, I., Trojani, M., 1988, Histopathologic grading in spindle cell soft tissue sarcomas. *Cancer* 61, 2305-2309.
- Cordon Cardo, C., Prives, C., 1999, At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med* 190, 1367-1370.
- Coussens, L.M., Raymond, W.W., Bergers, G., Laig Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Coughley, G.H., Hanahan, D., 1999, Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13, 1382-1397.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002, Inflammation and Cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Couto, S.S., Griffey, S.M., Duarte, P.C., Madewell, B.R., 2002, Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 39, 33-41.
- Coyne, M.J., Reeves, N.C., Rosen, D.K., 1997, Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc* 210, 249-251.
- Cross, M.J., Claesson Welsh, L., 2001, FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22, 201-207.
- Daly, M.K., Saba, C.F., Crochik, S.S., Howerth, E.W., Kosarek, C.E., Cornell, K.K., Roberts, R.E., Northrup, N.C., 2008, Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 10, 202-205.

- Dambach, D., Carlson, J., Riddle, D., Hendrick, M.J., 1996, Immunohistochemical identification and localization of growth factors in feline postvaccinal lesions. *Vet Pathol* 33, 607.
- Danielsen, A.J., Maihle, N.J., 2002, Ligand-independent oncogenic transformation by the EGF receptor requires kinase domain catalytic activity. *Exp Cell Res* 275, 9-16.
- Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G., 1990, Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63, 21-29.
- Day, M.J., 1998, Immunohistochemical characterization of the lesions of feline progressive lymphocytic cholangitis/cholangiohepatitis. *J Comp Pathol* 119, 135-147.
- de Larco, J.E., Todaro, G.J., 1978, Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4001-4005.
- De Man, M.M.G., Ducatelle, R.V., 2007, Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *J Feline Med Surg* 9, 432-434.
- Deim, Z., Palmi, N., Cserni, G., 2008, Feline vaccine-associated fibrosarcoma induced by aluminium compound in two cats: Short communication. *Acta Vet Hung* 56, 111-116.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., Balmain, A., 2001, TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.
- Derynck, R., Goeddel, D.V., Ullrich, A., Gutterman, J.U., Williams, R.D., Bringman, T.S., Berger, W.H., 1987, Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 47, 707-712.
- Desruisseau, S., Ghazarossian Ragni, E., Chinot, O., Martin, P.M., 1996, Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int J Cancer* 66, 796-801.
- Dinareello, C.A., 1988, Interleukin-1. *Ann N Y Acad Sci* 546, 122-132.
- Dinareello, C.A., 2006, The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25, 307-313.
- Doddy, F.D., Glickman, L.T., Glickman, N.W., Janovitz, E.B., 1996, Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol* 114, 165-174.
- Donnellan, I., Cantrill, J., Fraser, I., Morris, A., 1995, Activation by interferon-gamma of expression of ICAM-1 and MHC class II antigens in tumour cells from colorectal carcinomas. *Clin Mol Pathol* 48, M40-M45.
- Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A., Antoniades, H.N., 1983, Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221, 275-277.
- Dubielzig, R.R., Everitt, J., Shadduck, J.A., Albert, D.M., 1990, Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol* 27, 62-65.
- Dubielzig, R.R., Hawkins, K.L., Miller, P.E., 1993, Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *J Vet Diagn Invest* 5, 637-638.
- Elaraj, D.M., Weinreich, D.M., Varghese, S., Puhlmann, M., Hewitt, S.M., Carroll, N.M., Feldman, E.D., Turner, E.M., Alexander, H.R., 2006, The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 12, 1088-1096.
- Elliott, R.L., Blobe, G.C., 2005, Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol* 23, 2078-2093.
- Ellis, J.A., Jackson, M.L., Bartsch, R.C., McGill, L.G., Martin, K.M., Trask, B.R., Haines, D.M., 1996, Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J Am Vet Med Assoc* 209, 767-771.

- Erber, R., Thurnher, A., Katsen, A.D., Groth, G., Kerger, H., Hammes, H.P., Menger, M.D., Ullrich, A., Vajkoczy, P., 2004, Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 18, 338-340.
- Esplin, D.G., McGill, L.D., Meininger, A.C., Wilson, S.R., 1993, Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 202, 1245-1247.
- Folkman, J., 1990, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6.
- Folkman, J., Klagsbrun, M., 1987, Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
- Fonfara, S., 2002. In vitro Nachweis spontaner und Staupevirus-induzierter Zytokinexpression in verschiedenen kaninen Zelllinien mittels RT-PCR und Immunhistologie. Diss. Vet. Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Foss, D.L., Baarsch, M.J., Murtaugh, M.P., 1998, Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* 9, 67-78.
- Friedman, S.L., 1997, Closing in on the signals of hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 112, 1406-1409.
- Fukuda, T., Yamaguchi, T., Yamaki, T., Suzuki, T., 2001, Ovarian fibrosarcoma producing multiple cytokines. *Pathol Int* 51, 739-743.
- Furuhashi, M., Sjoblom, T., Abramsson, A., Ellingsen, J., Micke, P., Li, H., Bergsten Folestad, E., Eriksson, U., Heuchel, R., Betsholtz, C., Heldin, C.H., Ostman, A., 2004, Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res* 64, 2725-2733.
- Gabbiani, G., 1996, The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 192, 708-711.
- Gagnon, A.-C., 2000, Drug Injection-associated Fibrosarcoma in a Cat. *Feline Pract* 28, 18-21.
- Gagos, S., Irminger Finger, I., 2005, Chromosome instability in neoplasia: chaotic roots to continuous growth. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1014-1033.
- Gaskell R. M., G.G., Graham S. J., Skilton D. 2002. Final Report to the Veterinary Products Committee Working Group on Feline and Canine Vaccination (London, Department for Environment, Food and Rural Affairs).
- Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J., Walters, E.H., 2002, beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57, 765-770.
- Gobar, G.M., Kass, P.H., 2002, World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 220, 1477-1482.
- Gordon, H.M., Kucera, G., Salvo, R., Boss, J.M., 1992, Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair, and metabolism in murine fibroblasts. *J Immunol* 148, 4021-4027.
- Gorelik, L., Flavell, R.A., 2002, Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2, 46-53.
- Gospodarowicz, D., Neufeld, G., Schweigerer, L., 1987, Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl* 5, 15-26.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C., 1994, Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54, 4855-4878.
- Gressner, A.M., 1996, Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 54, 39-45.

- Gröne, A., Fonfara, S., Baumgärtner, W., 2002, Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection. *Viral Immunol* 15, 493-505.
- Grose, R., Dickson, C., 2005, Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 179-186.
- Grotendorst, G.R., 1997, Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 171-179.
- Guo, P., Hu, B., Gu, W., Xu, L., Wang, D., Huang, H.J., Cavenee, W.K., Cheng, S.Y., 2003, Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* 162, 1083-1093.
- Haas, J.V., 2008. Klinik, Labordiagnostik und verwendete Impfstoffe bei Katzen mit einem Fibrosarkom - Eine Übersicht über die Patienten der Medizinischen Kleintierklinik 1999-2007. Diss. Vet. Med. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Haller, F., Kulle, B., Schwager, S., Gunawan, B., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Fuzesi, L., 2004, Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Anal Biochem* 335, 1-9.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hautmann, M.B., Madsen, C.S., Owens, G.K., 1997, A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J Biol Chem* 272, 10948-10956.
- Hayek, A., Culler, F.L., Beattie, G.M., Lopez, A.D., Cuevas, P., Baird, A., 1987, An in vivo model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 876-880.
- Hendrick, M.J., 1998a, Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J Am Vet Med Assoc* 213, 1425-1426.
- Hendrick, M.J., 1998b, Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 213, 1422-1423.
- Hendrick, M.J., Brooks, J.J., 1994, Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 31, 126-129.
- Hendrick, M.J., Dunagan, C.A., 1991, Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). *J Am Vet Med Assoc* 198, 304-305.
- Hendrick, M.J., Goldschmidt, M.H., 1991, Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 199, 968.
- Hendrick, M.J., Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., Wang, Y.Y., Somlyo, A.P., 1992, Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 52, 5391-5394.
- Hendrick, M.J., Mahaffey, E.A., Moore, F.M., Vos, J.H., Walder, E.J. 1998. Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals, Schulman, F.Y., ed. (Washington, D. C., Armed Forces Institute of Pathology).
- Hendrick, M.J., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., Haviland, J.C., Schelling, S.H., Engler, S.J., Gliatto, J.M., 1994, Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc* 205, 1425-1429.
- Hershey, A.E., Dubielzig, R.R., Padilla, M.L., Helfand, S.C., 2005, Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Vet Pathol* 42, 805-811.



- Hershey, A.E., Sorenmo, K.U., Hendrick, M.J., Shofer, F.S., Vail, D.M., 2000, Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 216, 58-61.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton Piallat, M.L., Gabbiani, G., 2007, The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170, 1807-1816.
- Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I.J., Gyetko, M.R., Weiss, S.J., 1998, Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95, 365-377.
- Hirsch, D., 1995. Zytogenetische Analysen an feline Fibrosarkomen. Diss. Vet. Med. Veterinärmedizinische Universität, Wien.
- Hirschberger, J., 1987. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. Diss. Vet. Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Hirschberger, J., Kessler, M., 2001, Das feline Fibrosarkom. *Tierarztl Prax* 29, 66-71.
- Hsiao, Y.W., Liao, K.W., Hung, S.W., Chu, R.M., 2002, Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 19-27.
- Hudson, J.D., Shoabi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., Beach, D.H., 1999, A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190, 1375-1382.
- Huisinga, M., 2008. Immunhistologische Untersuchung zu MHC II-Expression bei Dermatitis von Hunden und Katzen. Diss. Med. Vet. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Hunt, P., McConnell, I., Grant, C.K., Else, R.W., Hopkins, J., 1995, Variable expression of major histocompatibility complex class II in the domestic cat. *Res Vet Sci* 59, 195-200.
- Jain, M.K., Layne, M.D., Watanabe, M., Chin, M.T., Feinberg, M.W., Sibinga, N.E., Hsieh, C.M., Yet, S.F., Stemple, D.L., Lee, M.E., 1998, In vitro system for differentiating pluripotent neural crest cells into smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273, 5993-5996.
- Jobson, T.M., Billington, C.K., Hall, I.P., 1998, Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest* 101, 2650-2657.
- Josten, M., Rudolph, R., 1997, Methods for the differentiation of giant cells in canine and feline neoplasias in paraffin sections. *Zentralbl Veterinarmed A* 44, 159-166.
- Kamenica, K., Th., B., Hirschberger, J., Köstlin, R., Hermanns, W., 2008, Vakzine-assoziierte feline Fibrosarkome: histopathologische Befunde und Prognose. *Tierarztl Prax* 36, 127-134.
- Kanda, K., Ueda, M., Futakuchi, H., Yamaguchi, H., Mori, K., Terai, Y., Ueki, M., 2005, Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 98, 453-461.
- Kandel, J., Bossy Wetzels, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., Hanahan, D., 1991, Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66, 1095-1104.
- Kappler, M., Kohler, T., Kampf, C., Diestelkötter, P., Wurl, P., Schmitz, M., Bartel, F., Lautenschlager, C., Rieber, E.P., Schmidt, H., Bache, M., Taubert, H., Meyer, A., 2001, Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 95, 360-363.
- Kass, P.H., Barnes, W.G., Jr., Spangler, W.L., Chomel, B.B., Culbertson, M.R., 1993, Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 203, 396-405.
- Katayama, R., Huelsmeyer, M.K., Marr, A.K., Kurzman, I.D., Thamm, D.H., Vail, D.M., 2004, Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 54, 25-33.

- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., Fauci, A.S., 1986, Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163, 1037-1050.
- Kessler, Y., Helfer-Hungerbuehler, A.K., Cattori, V., Meli, M.L., Zellweger, B., Ossent, P., Riond, B., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2009, Quantitative TaqMan® real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. *BMC Mol Biol*, doi: 10.1186/1471-2199-1110-1106.
- Kidney, B.A., 2008, Role of inflammation/wound healing in feline oncogenesis: a commentary. *J Feline Med Surg* 10, 107-109.
- Kidney, B.A., Ellis, J.A., Haines, D.M., Jackson, M.L., 2000, Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 61, 1037-1041.
- Kidney, B.A., Ellis, J.A., Haines, D.M., Jackson, M.L., 2001a, Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 62, 1990-1994.
- Kidney, B.A., Haines, D.M., Ellis, J.A., Burnham, M., Jackson, M.L., 2001b, Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 62, 828-832.
- Kidney, B.A., Haines, D.M., Ellis, J.A., Burnham, M.L., Jackson, M.L., 2002, Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *Am J Vet Res* 63, 60-63.
- Kidney, B.A., Haines, D.M., Ellis, J.A., Burnham, M.L., Teifke, J.P., Czerwinski, G., Jackson, M.L., 2001c, Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 62, 833-839.
- Kikuchi, K., Soma, Y., Fujimoto, M., Kadono, T., Sato, S., Abe, M., Ohhara, K., Takehara, K., 1993, Dermatofibrosarcoma protuberans: increased growth response to platelet-derived growth factor BB in cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 409-415.
- Kim, J.W., Kim, S.J., Han, S.M., Paik, S.Y., Hur, S.Y., Kim, Y.W., Lee, J.M., Namkoong, S.E., 1998, Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human cervical cancers. *Gynecol Oncol* 71, 266-269.
- Kipar, A., 1994. Klassifizierung und Dignität der Rundzelltumoren der Haut und kutanen Schleimhaut des Hundes. Diss. Vet. Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Kipar, A., 2002. Zur Pathogenese der Felinen Infektiösen Peritonitis. Habil. Med. Vet. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Kipar, A., Baptiste, K., Meli, M.L., Barth, A., Knietzsch, M., Reinacher, M., Lutz, H., 2005, Age-related dynamics of constitutive cytokine transcription levels of feline monocytes. *Exp Gerontol* 40, 243-248.
- Kipar, A., Baumgartner, W., Kremmer, E., Frese, K., Weiss, E., 1998, Expression of major histocompatibility complex class II antigen in neoplastic cells of canine cutaneous histiocytoma. *Vet Immunol Immunopathol* 62, 1-13.
- Kipar, A., Leutenegger, C.M., Hetzel, U., Akens, M.K., Mislin, C.N., Reinacher, M., Lutz, H., 2001, Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 78, 305-315.
- Kirpensteijn, J., 2006, Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Vet Microbiol* 117, 59-65.
- Kitamura, K., Kasuya, K., Tsuchida, A., Mimuro, A., Inoue, K., Aoki, T., Aoki, T., Koyanagi, Y., 2003, Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta in gallbladder cancer. *Oncol Rep* 10, 327-332.

- Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C.A., Apte, R.N., 2007, Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res* 67, 1062-1071.
- Lejeune, F.J., Ruegg, C., Lienard, D., 1998, Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 10, 573-580.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998, Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Leutenegger, C.M., Mislin, C.N., Sigrist, B., Ehrenguber, M.U., Hofmann Lehmann, R., Lutz, H., 1999, Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 291-305.
- Leveen, P., Pekny, M., Gebre Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., Betsholtz, C., 1994, Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8, 1875-1887.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A., 1991, The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
- Levy, L., Hill, C.S., 2006, Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 41-58.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., Alexander, H.R., 2006, Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* 4, 48.
- Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006, Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605-612.
- Libby, P., Ordovas, J.M., Birinyi, L.K., Auger, K.R., Dinarello, C.A., 1986, Inducible interleukin-1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 78, 1432-1438.
- Lindahl, P., Johansson, B.R., Leveen, P., Betsholtz, C., 1997, Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277, 242-245.
- Liotta, L.A., Steeg, P.S., Stetler Stevenson, W.G., 1991, Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336.
- Liu, W., Saint, D.A., 2002, Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 347-353.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lobb, R.R., Alderman, E.M., Fett, J.W., 1985, Induction of angiogenesis by bovine brain derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry* 24, 4969-4973.
- Lu, H., Ouyang, W., Huang, C., 2006, Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 4, 221-233.
- Lu, H., Zhang, Y., Roberts, D.D., Osborne, C.K., Templeton, N.S., 2002, Enhanced gene expression in breast cancer cells in vitro and tumors in vivo. *Mol Ther* 6, 783-792.
- Macy, D.W., Hendrick, M.J., 1996, The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26, 103-109.
- Madewell, B.R., Griffey, S.M., McEntee, M.C., Leppert, V.J., Munn, R.J., 2001, Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol* 38, 196-202.
- Malik, S.T., Griffin, D.B., Fiers, W., Balkwill, F.R., 1989, Paradoxical effects of tumour necrosis factor in experimental ovarian cancer. *Int J Cancer* 44, 918-925.

- Malik, S.T., Naylor, M.S., East, N., Oliff, A., Balkwill, F.R., 1990, Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur J Cancer* 26, 1031-1034.
- Mallat, A., Gallois, C., Tao, J., Habib, A., Maclof, J., Mavier, P., Preaux, A.M., Lotersztajn, S., 1998, Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 273, 27300-27305.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., Sica, A., 2004, Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol* 14, 155-160.
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A., 2006, Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25, 315-322.
- Marhaba, R., Nazarenko, I., Knöfler, D., Reich, E., Voronov, E., Vitacolonna, M., Hildebrand, D., Elter, E., Apte, R.N., Zöller, M., 2008, Opposing effects of fibrosarcoma cell-derived IL-1 alpha and IL-1 beta on immune response induction. *Int J Cancer* 123, 134-145.
- Martins Green, M., Boudreau, N., Bissell, M.J., 1994, Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res* 54, 4334-4341.
- Masi, L., Malentacchi, C., Campanacci, D., Franchi, A., 2002, Transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in chondrosarcoma of bone. *Virchows Arch* 440, 491-497.
- Massague, J., Blain, S.W., Lo, R.S., 2000, TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Mauviel, A., Heino, J., Kahari, V.M., Hartmann, D.J., Loyau, G., Pujol, J.P., Vuorio, E., 1991, Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 96, 243-249.
- Mayr, B., Blauensteiner, J., Edlinger, A., Reifinger, M., Alton, K., Schaffner, G., Brem, G., 2000, Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Res Vet Sci* 68, 63-70.
- Mayr, B., Bockstahler, B., Loupal, G., Reifinger, M., Schleger, W., 1996, Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res Vet Sci* 61, 268-270.
- Mayr, B., Eschborn, U., Kalat, M., 1991, Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 38, 617-620.
- Mayr, B., Hofstadler, E., Schleger, W., Reifinger, M., Eisenmenger, E., 1994, Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 41, 197-201.
- Mayr, B., Reifinger, M., Alton, K., Schaffner, G., 1998a, Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun* 22, 249-255.
- Mayr, B., Wegscheider, H., Reifinger, M., Jugl, T., 1998b, Cytogenetic alterations in four feline soft-tissue tumours. *Vet Res Commun* 22, 21-29.
- McNiel, E.A., 2001, Vaccine-Associated Sarcomas in Cats. *Clin Orthop Relat Res* 382, 21-27.
- Menzel, T., Fletcher, C.D., 1997, The emerging role of myofibroblasts in soft tissue neoplasia. *Am J Clin Pathol* 107, 2-5.
- Mighell, A.J., Robinson, P.A., Hume, W.J., 1996, PCNA and Ki-67 immunoreactivity in multinucleated cells of giant cell fibroma and peripheral giant cell granuloma. *J Oral Pathol Med* 25, 193-199.

- Mignatti, P., Rifkin, D.B., 2000, Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 78, 103-157.
- Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E., Rifkin, D.B., 1989, In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 108, 671-682.
- Miki, R., Okuda, M., Oikawa, T., Watanabe, M., Ma, Z., Matsumoto, K., Iwata, H., Inokuma, H., 2004, Centrosome amplification and chromosomal instability in feline lymphoma cell lines. *J Vet Med Sci* 66, 797-805.
- Mills, B.G., Frausto, A., Brien, E., 2000, Cytokines associated with the pathophysiology of aggressive fibromatosis. *J Orthop Res* 18, 655-662.
- Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P., Nitti, D., 2005, Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 35-53.
- Moore, R.J., Owens, D.M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., Kollias, G., Balkwill, F., 1999, Mice deficient in tumor necrosis factor- $\alpha$  are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 5, 828-831.
- Moscatelli, D., Presta, M., Joseph Silverstein, J., Rifkin, D.B., 1986, Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 129, 273-276.
- Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., Heldin, C.H., 2002, Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 82, 85-91.
- Muchaneta Kubara, E.C., el Nahas, A.M., 1997, Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant* 12, 904-915.
- Munday, J.S., Stedman, N.L., Richey, L.J., 2003, Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas. *Vet Pathol* 40, 288-293.
- Nagel, M.-L., 1998, Fibrosarkome der Katze. *Prakt Tierarzt* 79, 600-606.
- Nambiar, P.R., Jackson, M.L., Ellis, J.A., Chelack, B.J., Kidney, B.A., Haines, D.M., 2001, Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol* 38, 236-238.
- Nazarenko, I., Marhaba, R., Reich, E., Voronov, E., Vitacolonna, M., Hildebrand, D., Elter, E., Rajasagi, M., Apte, R.N., Zöller, M., 2008, Tumorigenicity of IL-1 $\alpha$ - and IL-1 $\beta$ -Deficient Fibrosarcoma Cells. *Neoplasia* 10, 549-562.
- Nguyen Van, N., Taglinger, K., Helps, C.R., Tasker, S., Gruffydd Jones, T.J., Day, M.J., 2006, Measurement of cytokine mRNA expression in intestinal biopsies of cats with inflammatory enteropathy using quantitative real-time RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 404-414.
- Nicola, N.A., Hall, W., E., H. 1997. *Guidebook to Cytokines and Their Receptors* (Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press).
- Nieto, A., Sanchez, M.A., Martinez, E., Rollan, E., 2003, Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor- $\alpha$  in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol* 40, 651-658.
- Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D., Mannel, D.N., 1993, Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 177, 1391-1398.
- Ostman, A., 2004, PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 275-286.
- Pace, L.W., Kreeger, J.M., Miller, M.A., Turk, J.R., Fischer, J.R., 1994, Immunohistochemical staining of feline malignant fibrous histiocytomas. *Vet Pathol* 31, 168-172.

- Palladino, M.A., Jr., Shalaby, M.R., Kramer, S.M., Ferraiolo, B.L., Baughman, R.A., Deleo, A.B., Crase, D., Marafino, B., Aggarwal, B.B., Figari, I.S., et al., 1987, Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J Immunol* 138, 4023-4032.
- Pang, G., Couch, L., Batey, R., Clancy, R., Cripps, A., 1994, GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol* 96, 437-443.
- Pech, M., Gazit, A., Arnstein, P., Aaronson, S.A., 1989, Generation of fibrosarcomas in vivo by a retrovirus that expresses the normal B chain of platelet-derived growth factor and mimics the alternative splice pattern of the v-sis oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2693-2697.
- Perez, J., Day, M.J., Martin, M.P., Gonzalez, S., Mozos, E., 1999a, Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). *Vet Immunol Immunopathol* 69, 33-46.
- Perez, J., Day, M.J., Mozos, E., 1998, Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol* 64, 133-147.
- Perez, J., Mozos, E., Martin, M.P., Day, M.J., 1999b, Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with equine squamous cell carcinoma. *J Comp Pathol* 121, 385-397.
- Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F., Weinberg, R.A., 2001, TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3, 708-714.
- Pertovaara, L., Kaipainen, A., Mustonen, T., Orpana, A., Ferrara, N., Saksela, O., Alitalo, K., 1994, Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269, 6271-6274.
- Petterino, C., Modesto, P., Strata, D., Vascellari, M., Mutinelli, F., Ferrari, A., Ratto, A., 2009, A case of interscapular fibrosarcoma in a dwarf rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Vet Diagn Invest* 21, 900-905.
- Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.
- Porta, C., Subhra Kumar, B., Larghi, P., Rubino, L., Mancino, A., Sica, A., 2007, Tumor promotion by tumor-associated macrophages. *Adv Exp Med Biol* 604, 67-86.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B., 1999, Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277, C1-9.
- Powers, B.E., Hoopes, P.J., Ehrhart, E.J., 1995, Tumor diagnosis, grading, and staging. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 10, 158-167.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M., 2005, Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 159-178.
- Presta, M., Moscatelli, D., Joseph Silverstein, J., Rifkin, D.B., 1986, Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol* 6, 4060-4066.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004, Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-862.

- Rasheed, S., Nelson Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., Gardner, M.B., 1974, Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-1033.
- Reinacher, M., Theilen, G., 1987, Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 48, 939-945.
- Rezanka, L.J., Rojko, J.L., Neil, J.C., 1992, Feline leukemia virus: pathogenesis of neoplastic disease. *Cancer Invest* 10, 371-389.
- Richards, J.R., 1997, Feline sarcoma task force meets. *J Am Vet Med Assoc* 210, 310-311.
- Rideout, B.A., Moore, P.F., Pedersen, N.C., 1990, Distribution of MHC class II antigens in feline tissues and peripheral blood. *Tissue Antigens* 36, 221-227.
- Robbins, Cotran, 2005, *Pathologic Basis of Disease*, 7. Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Roche, W.R., 1990, Myofibroblasts. *J Pathol* 161, 281-282.
- Roessner, A., Vassallo, J., Vollmer, E., Zwadlo, G., Sorg, C., Grundmann, E., 1987, Biological characterization of human bone tumors. X. The proliferation behavior of macrophages as compared to fibroblastic cells in malignant fibrous histiocytoma and giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 113, 559-562.
- Roessner, A., Vollmer, E., Zwadlo, G., Sorg, C., Kolve, M., von Bassewitz, D.B., Wuisman, P., Harle, A., Grundmann, E., 1989, The cytogenesis of macrophages and osteoclast-like giant cells in bone tumors with special emphasis on the so-called fibrohistiocytic tumors. *Curr Top Pathol* 80, 205-227.
- Romanelli, G., Marconato, L., Olivero, D., Massari, F., Zini, E., 2008, Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001-2007). *J Am Vet Med Assoc* 232, 1193-1199.
- Ronnov Jessen, L., Petersen, O.W., Koteliarsky, V.E., Bissell, M.J., 1995, The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest* 95, 859-873.
- Rosai, J., 1990, Liver cell carcinoma with osteoclast-like giant cells: nonepitheliogenic giant cells in diverse malignancies. *Hepatology* 12, 782-783.
- Sandusky, G., Teter, K., Holloway, D., 1993, PCNA and Ki-67, immunostaining in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from various domestic animals. *Vet. Pathol.* 30, 450.
- Schäfer, H.E., Fischer, R., 1977, Aussagemöglichkeiten des zytochemischen Nachweises saurer Phosphatase an konventionellen Paraffinschnitten. *Zentralbl Allg Pathol* 121, 577.
- Schuster, N., Krieglstein, K., 2002, Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 307, 1-14.
- Seifert, R.A., Coats, S.A., Raines, E.W., Ross, R., Bowen Pope, D.F., 1994, Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor alpha-subunit mutant and reconstituted cell lines demonstrate that transforming growth factor-beta can be mitogenic through PDGF A-chain-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 269, 13951-13955.
- Serini, G., Gabbiani, G., 1999, Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250, 273-283.
- Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hong, S.H., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2001, Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *Am J Vet Res* 62, 1134-1141.
- Shaw, C., Kent, M.S., Gordon, I.K., Collins, C.J., Greasby, T.A., Beckett, L.A., Hammond, G.M., 2009, Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1190-2006). *J Am Vet Med Assoc* 234, 376-380.

- Shi, Y., O'Brien, J.E., Jr., Fard, A., Zalewski, A., 1996, Transforming growth factor-beta 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1298-1305.
- Shing, Y., Folkman, J., Haudenschild, C., Lund, D., Crum, R., Klagsbrun, M., 1985, Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J Cell Biochem* 29, 275-287.
- Sica, A., Sacconi, A., Mantovani, A., 2002, Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol* 2, 1045-1054.
- Sieweke, M.H., Thompson, N.L., Sporn, M.B., Bissell, M.J., 1990, Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF-beta. *Science* 248, 1656-1660.
- Skalli, O., Schurch, W., Seemayer, T., Lagace, R., Montandon, D., Pittet, B., Gabbiani, G., 1989, Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 60, 275-285.
- Smits, A., Funai, K., Vassbotn, F.S., Beausang-Linder, M., af Ekenstam, F., Heldin, C.H., Westermark, B., Nister, M., 1992, Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in proliferative disorders of fibroblastic origin. *Am J Pathol* 140, 639-648.
- Sondgeroth, K., Leutenegger, C., Vandewoude, S., 2005, Development and validation of puma (*Felis concolor*) cytokine and lentivirus real-time PCR detection systems. *Vet Immunol Immunopathol* 104, 205-213.
- Stemme, S., Fager, G., Hansson, G.K., 1990, MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology* 69, 243-249.
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Jr., Cuculis, J.J., Meyer, H.G., 1970, The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18, 315-333.
- Stokes, C.L., Rupnick, M.A., Williams, S.K., Lauffenburger, D.A., 1990, Chemotaxis of human microvessel endothelial cells in response to acidic fibroblast growth factor. *Lab Invest* 63, 657-668.
- Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., van Kooten, C., Muller, G., 2001, TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59, 579-592.
- Suntz, M., 2007. Untersuchung zu Vorkommen und Bedeutung latenter Infektionen mit dem Felinen Leukämievirus (FeLV) bei Sektionskatzen. Diss. Vet. Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2008, Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 652-656.
- Tamm, E.R., Siegner, A., Baur, A., Lutjen Drecoll, E., 1996, Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle-actin expression in cultured human and monkey trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 62, 389-397.
- Terranova, V.P., DiFlorio, R., Lyall, R.M., Hic, S., Friesel, R., Maciag, T., 1985, Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 101, 2330-2334.
- Tetsuka, T., Baier, L.D., Morrison, A.R., 1996, Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 271, 11689-11693.
- Theilen, G.H., Kawakami, T.G., Rush, J.D., Munn, R.J., 1969, Replication of cat leukemia virus in cell suspension cultures. *Nature* 222, 589-590.



- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., 1999, Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.
- Thomas, D.A., Massague, J., 2005, TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369-380.
- Thomas, K.A., Rios Candelore, M., Gimenez Gallego, G., DiSalvo, J., Bennett, C., Rodkey, J., Fitzpatrick, S., 1985, Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6409-6413.
- Thomas, R., Valli, V.E., Ellis, P., Bell, J., Karlsson, E.K., Cullen, J., Lindblad-Toh, K., Langford, C., Breen, M., 2009, Microarray-based cytogenetic profiling reveals recurrent and subtype-associated genomic copy number aberrations in feline sarcomas. *Chromosome Res* 17, 987-1000.
- Ueda, M., Ueki, M., Terai, Y., Ueki, K., Kumagai, K., Fujii, H., Yoshizawa, K., Nakajima, M., 1999, Biological implications of growth factors on the mechanism of invasion in gynecological tumor cells. *Gynecol Obstet Invest* 48, 221-228.
- Valentich, J.D., Popov, V., Saada, J.I., Powell, D.W., 1997, Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* 272, C1513-1524.
- Van de Wiel, P.A., Bloksma, N., Kuper, C.F., Hofhuis, F.M., Willers, J.M., 1989, Macroscopic and microscopic early effects of tumour necrosis factor on murine Meth A sarcoma, and relation to curative activity. *J Pathol* 157, 65-73.
- Vascellari, M., Melchioti, E., Bozza, M.A., Mutinelli, F., 2003, Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50, 286-291.
- Wang, J., Coltrera, M.D., Gown, A.M., 1994, Cell proliferation in human soft tissue tumors correlates with platelet-derived growth factor B chain expression: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Cancer Res* 54, 560-564.
- Waterfield, M.D., Scrace, G.T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C.H., Huang, J.S., Deuel, T.F., 1983, Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature* 304, 35-39.
- Weiss, D.C., McClay, C.B., Christopher, M.M., Murphy, M., Perman, V., 1990, Effects of propylene glycol-containing diets on acetaminophen-induced methemoglobinemia in cats. *J Am Vet Med Assoc* 196, 1816-1819.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003, Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Chembiochem* 4, 1120-1128.
- Yamamoto, T., Kozawa, O., Tanabe, K., Akamatsu, S., Matsuno, H., Dohi, S., Uematsu, T., 2001, Involvement of p38 MAP kinase in TGF-beta-stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 82, 591-598.
- Yang, T.J., Chandler, J.P., Dunne Anway, S., 1987, Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. *Br J Cancer* 55, 131-134.
- Zeiss, C.J., Johnson, E.M., Dubielzig, R.R., 2003, Feline intraocular tumors may arise from transformation of lens epithelium. *Vet Pathol* 40, 355-362.
- Zicha, D., Genot, E., Dunn, G.A., Kramer, I.M., 1999, TGFbeta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. *J Cell Sci* 112, 447-454.

## 8 Tabellen

**Tabelle 8.1: Auszählung der Chromosomen**

<b>Zelllinie</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>
Chromosomen- zahl pro Zelle	41	51	73	43	73
	27	39	62	46	56
	59	47	39	36	46
	39	47	47	50	53
	54	44	75	36	49
	40	54	58	47	48
	45	36	63	52	58
	46	50	23	39	40
	64	41	47	43	62
	47	42	85	50	158
	48	45	82	45	57
	47	52	89	50	115
	49	58	144	47	60
	42	39	66	44	52
		32	72	57	44
		37	76	44	62
		51	56	41	105
		27	42	52	118
		60	48	46	38
		38	60	55	73
		47	116	43	152
		53	99	60	101
		113	57	54	75
		106	118	39	125
		108	107	43	153

Tabelle 8.2 C<sub>T</sub>-Werte aller Proben für die verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokine und GAPDH

Probe	EGF		FGF2		PDGF		TGFβ1		IL-1		TNF		GAPDH	
T1	34,10	32,47	33,37	31,14	30,66	30,70	25,23	25,47	30,01	30,05	30,84	30,36	22,76	22,83
T2	35,07	36,80	31,58	30,43	32,05	32,58	27,58	28,22	30,39	30,45	30,56	30,36	23,66	25,31
T3	45,00	45,00	31,19	29,76	28,39	28,43	24,21	24,33	30,87	31,02	30,77	32,63	22,31	22,37
T4	32,94	32,01	30,27	30,34	27,94	29,17	25,09	26,12	32,11	31,78	31,00	30,90	22,35	22,13
T5	31,06	31,19	30,20	28,92	29,20	29,81	25,35	24,93	29,16	29,52	27,63	27,79	22,86	22,62
L1	45,00	45,00	32,86	32,94	34,15	34,52	27,04	26,74	45,00	45,00	45,00	38,32	23,73	24,99
L2	45,00	45,00	33,07	32,85	45,00	45,00	32,23	31,97	45,00	45,00	45,00	45,00	25,48	25,51
L3	36,30	45,00	32,42	32,61	35,64	36,45	28,32	29,08	45,00	45,00	45,00	38,63	23,71	23,04
L4	45,00	45,00	32,71	32,74	38,32	37,40	31,45	31,87	45,00	45,00	38,08	38,43	25,55	26,14
L5	45,00	45,00	32,48	32,63	33,25	35,76	27,59	27,79	45,00	45,00	45,00	45,00	24,07	24,67
KH1	32,77	31,14	36,05	36,39	32,80	30,43	32,23	32,17	45,00	45,00	38,52	36,00	24,53	24,66
KH2	34,82	37,43	29,73	29,85	28,27	27,77	27,85	27,40	40,47	38,68	38,02	38,28	23,62	24,30
KH3	37,01	37,42	31,20	31,39	28,82	28,78	27,05	27,48	36,59	36,70	34,59	35,18	25,22	25,21
KZ1	45,00	36,99	31,10	31,20	35,19	35,98	28,84	29,02	45,00	39,42	38,57	45,00	26,30	25,97
KZ2	45,00	45,00	31,23	31,37	36,23	35,34	29,3	28,87	32,46	32,43	33,98	33,45	26,88	25,25

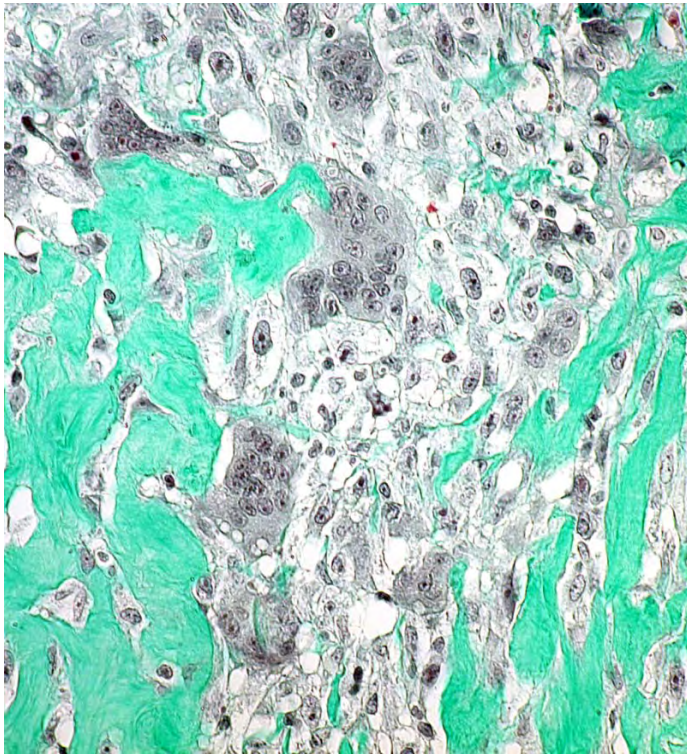
**Tabelle 8.3: Mittelwerte der im Doppelansatz gemessenen  $C_T$ -Werte für die verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokine und GAPDH**

Probe	EGF	FGF2	PDGF	TGF $\beta$ 1	IL-1	TNF	GAPDH
T1	33,29	32,26	30,68	25,35	30,03	30,60	22,80
T2	35,94	31,01	32,32	27,90	30,42	30,46	24,49
T3	45,00	30,48	28,41	24,27	30,95	31,70	22,34
T4	32,48	30,31	28,56	25,61	31,95	30,95	22,24
T5	31,13	29,56	29,51	25,14	29,34	27,71	22,74
L1	45,00	32,90	34,34	26,89	45,00	41,66	24,36
L2	45,00	32,96	45,00	32,10	45,00	45,00	25,50
L3	40,65	32,96	36,05	28,70	45,00	41,82	23,38
L4	45,00	32,73	37,86	31,66	45,00	38,26	25,85
L5	45,00	32,56	34,51	27,69	45,00	45,00	24,37
KHA	32,00	36,22	31,62	32,20	45,00	37,26	24,60
KHB	36,13	29,79	28,02	27,63	39,58	38,15	23,96
KHC	37,22	31,30	28,80	27,27	36,65	34,89	25,22
KZA	41,00	31,15	35,59	28,93	42,21	41,79	26,14
KZB	45,00	31,30	35,79	29,09	32,45	33,72	26,07
KZC	45,00	32,43	38,11	28,58	35,54	33,78	24,16

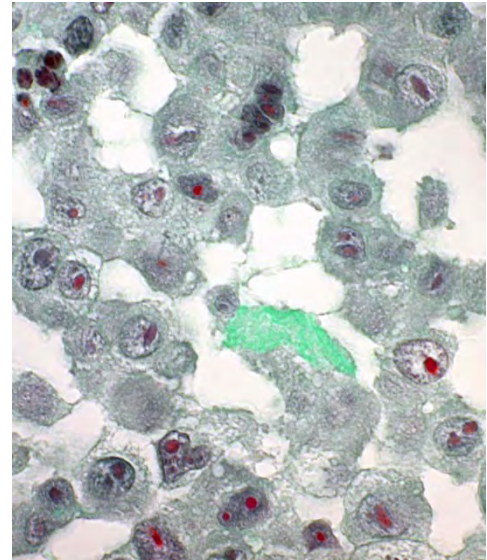
**Tabelle 8.4:  $\Delta C_T$ -Werte für die verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokine**

	EGF	FGF2	PDGF	TGF $\beta$ 1	IL-1	TNF
T1	10,49	9,46	7,88	2,55	7,23	7,80
T2	11,45	6,52	7,83	3,41	5,93	5,97
T3	22,66	8,14	6,07	1,93	8,61	9,36
T4	10,24	8,07	6,32	3,37	9,71	8,71
T5	8,39	6,82	6,77	2,40	6,60	4,97
L1	20,64	8,54	9,98	2,53	20,64	17,30
L2	19,50	7,46	19,5	6,60	19,50	19,50
L3	17,27	9,58	12,67	5,32	21,62	18,44
L4	19,15	6,88	12,01	5,81	19,15	12,41
L5	20,63	8,19	10,14	3,32	20,63	20,63
KHA	7,36	11,62	7,02	7,60	20,40	12,66
KHB	12,17	5,83	4,06	3,67	15,62	14,19
KHC	12,00	6,08	3,58	2,05	11,43	9,67
KZA	14,86	5,01	9,45	2,79	16,07	15,65
KZB	18,93	5,23	9,72	3,02	6,38	7,65
KZC	20,84	8,27	13,95	4,42	11,38	9,62

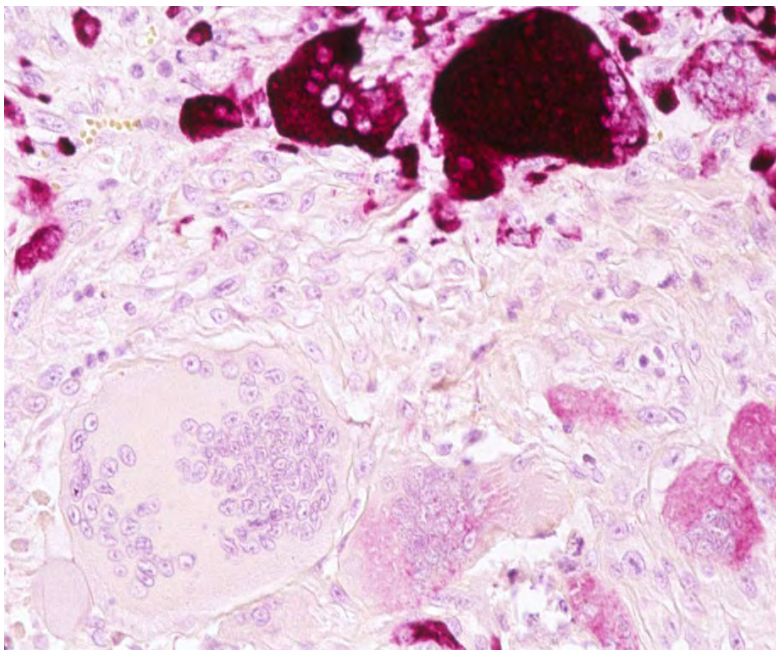
## 9 Abbildungen



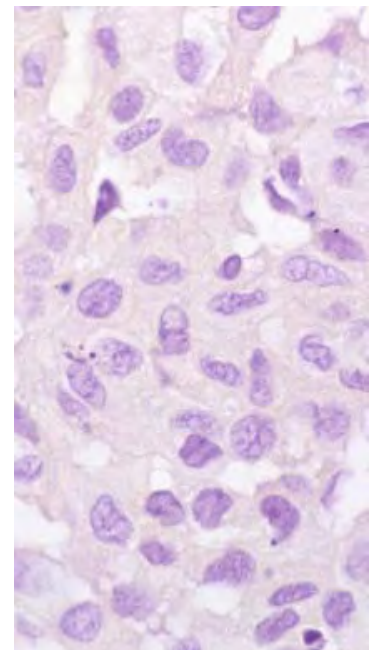
**Abbildung 10: Mäßiger Kollagengehalt in T4, Goldner, 40 × Obj.**



**Abbildung 11: Kollagenbildung in L4, Goldner, 100 × Obj.**

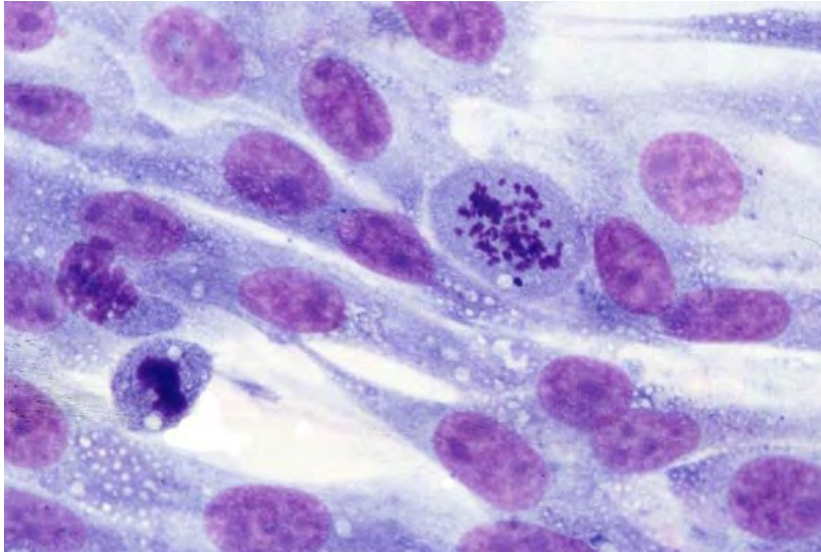


**Abbildung 12: TRAP-positive und TRAP-negative mehrkernige Riesenzellen in T4, 40 × Obj.**

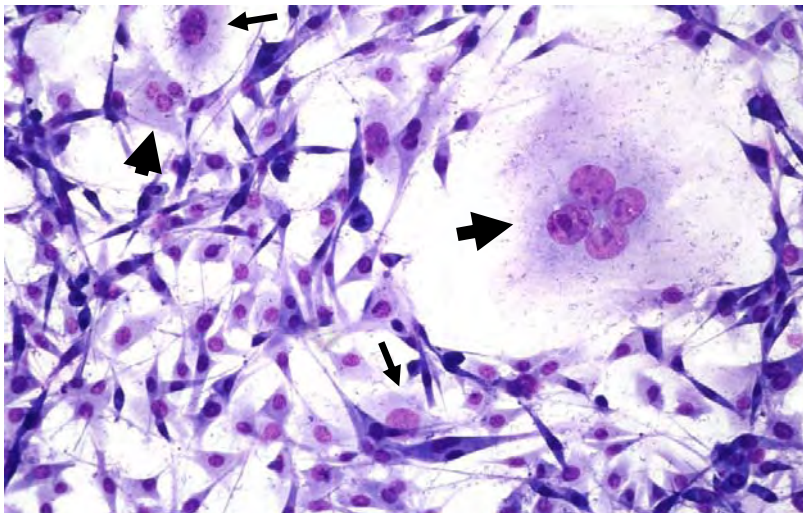


**Abbildung 13: TRAP-negative Zellen von L4, 100 × Obj.**

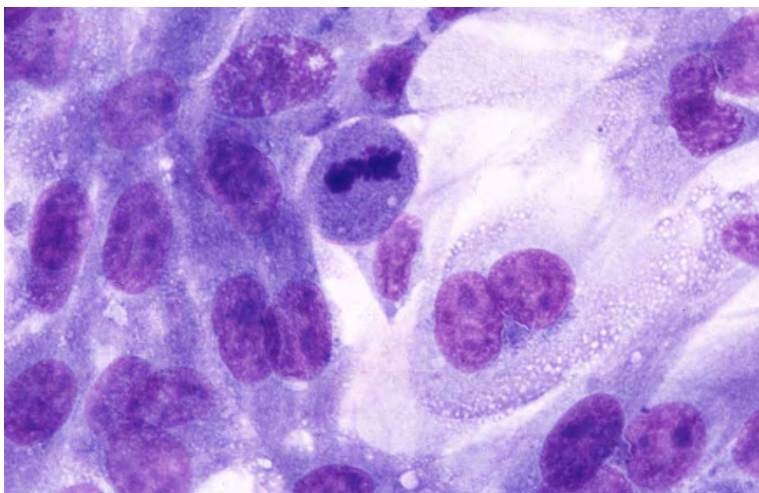




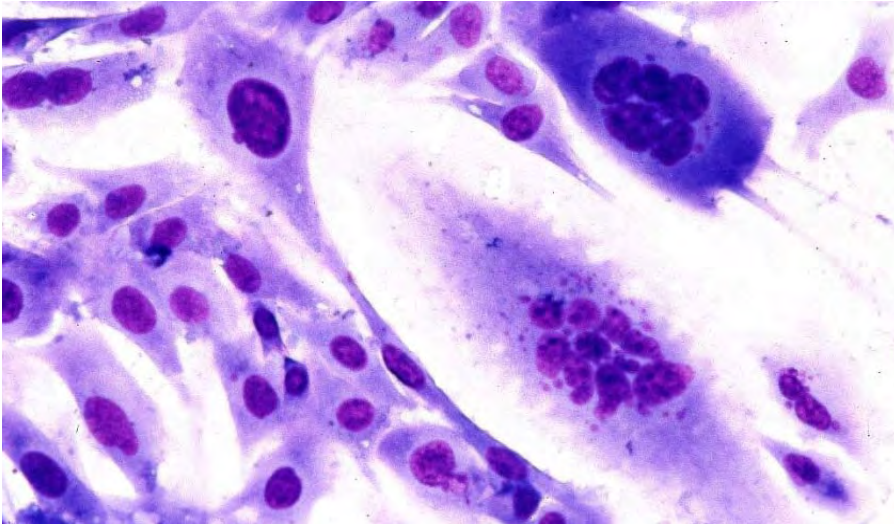
**Abbildung 14: Atypische Mitose in L1 P79, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj.**



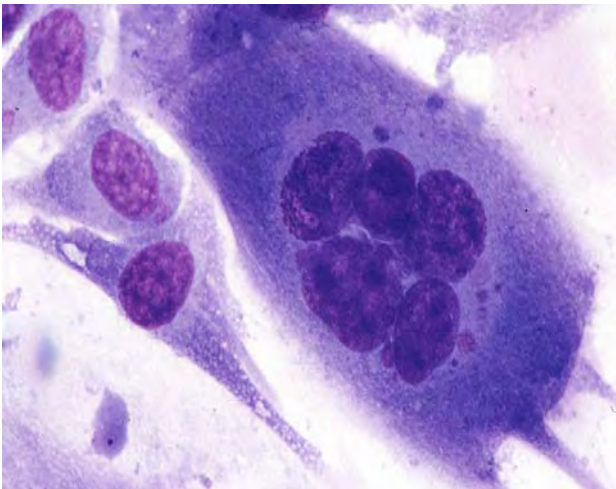
**Abbildung 15: Gestreckte, dreieckige und polygonale Zellen, einkernige Riesenzellen (dünne Pfeile), mehrkernige Riesenzellen (dicke Pfeile) in L5 P9, Chamberslide, Pappenheim, 20 × Obj.**



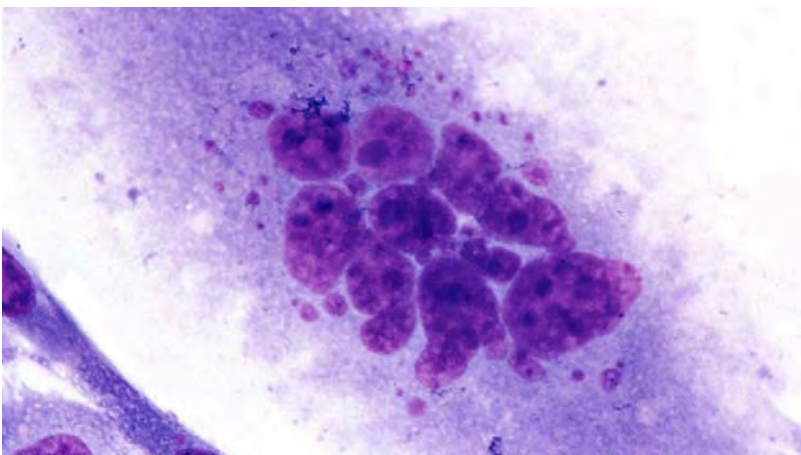
**Abbildung 16: Zweikernige Riesenzelle, Mitose in L1 P79, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj.**



**Abbildung 17: Mehrkernige Riesenzelle, einkernige große Zelle in L4 P13, Chamberslide, Pappenheim, 40 × Obj.**

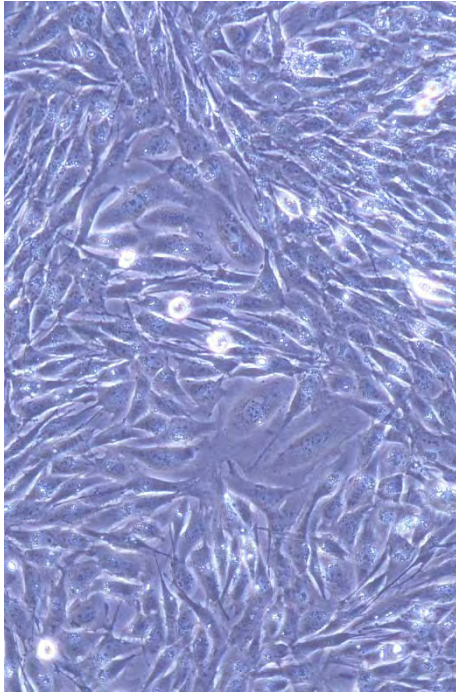


**Abbildung 18: Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 17; mehrkernige Riesenzelle und einkernige Zellen in L4 P13, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj.**

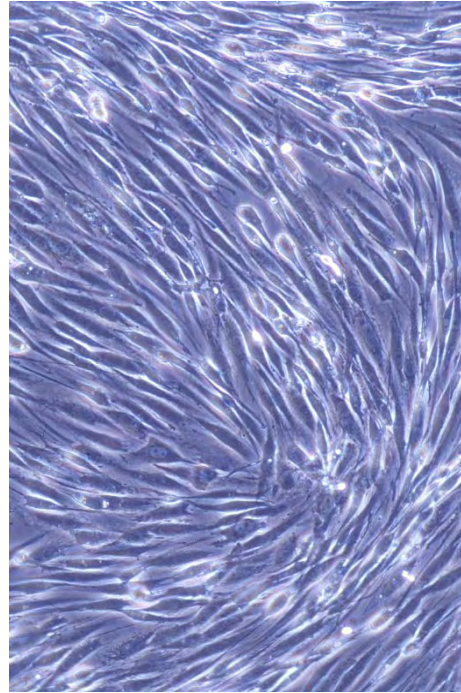


**Abbildung 19: Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 17; mehrkernige Riesenzelle in L4 P13, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj.**

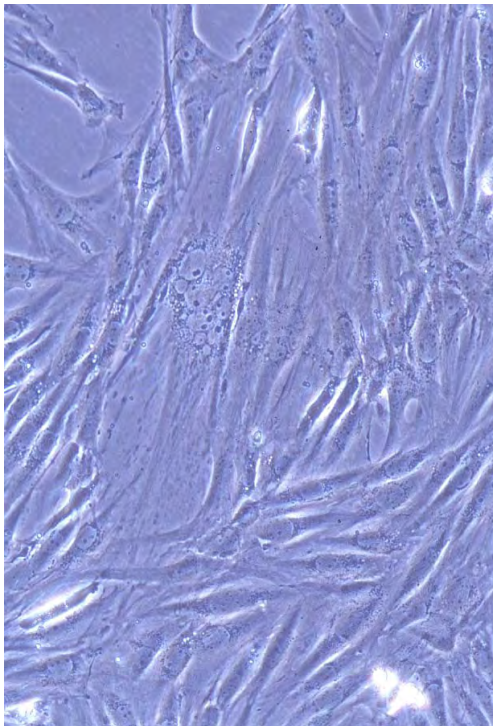




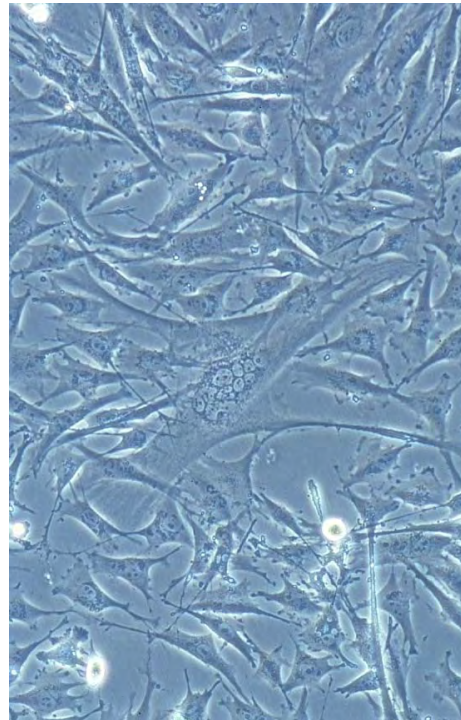
**Abbildung 20:** Gestreckte und polygonale Zellen, mehrkernige Riesenzelle, L1 P80, Kulturflasche, 20 × Obj.



**Abbildung 21:** Typische Anordnung von gestreckten Zellen im „Fischgrätmuster“, L2 P72, Kulturflasche, 20 × Obj.

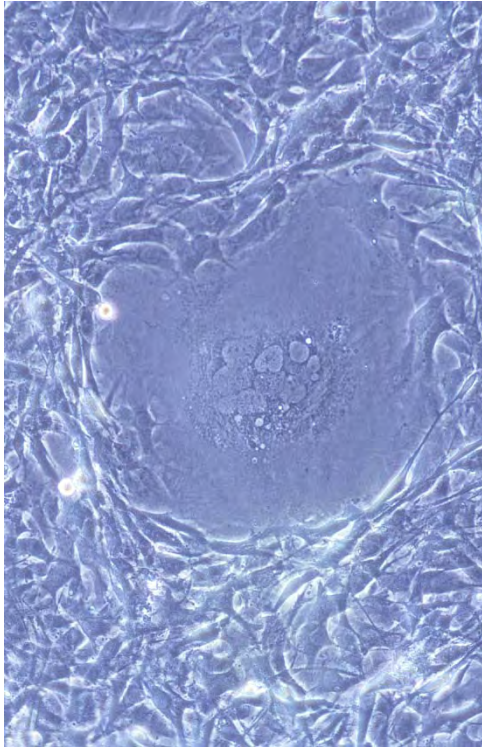


**Abbildung 22:** Spindelförmige Zellen und mehrkernige Riesenzellen in L3 P20, Kulturflasche, 20 × Obj.

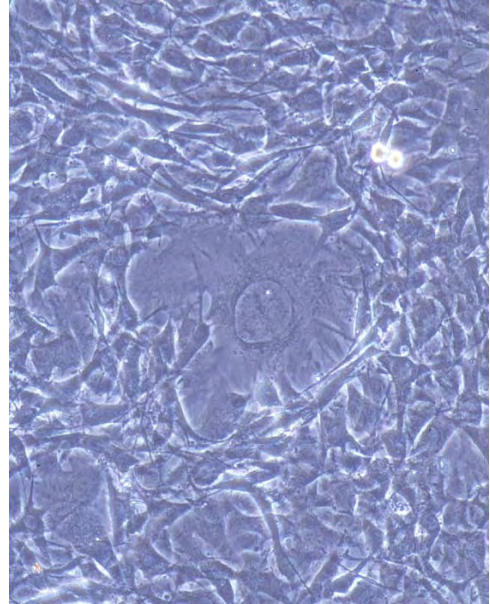


**Abbildung 23:** Mehrkernige Riesenzelle in L4 P 28, Kulturflasche, 20 × Obj.

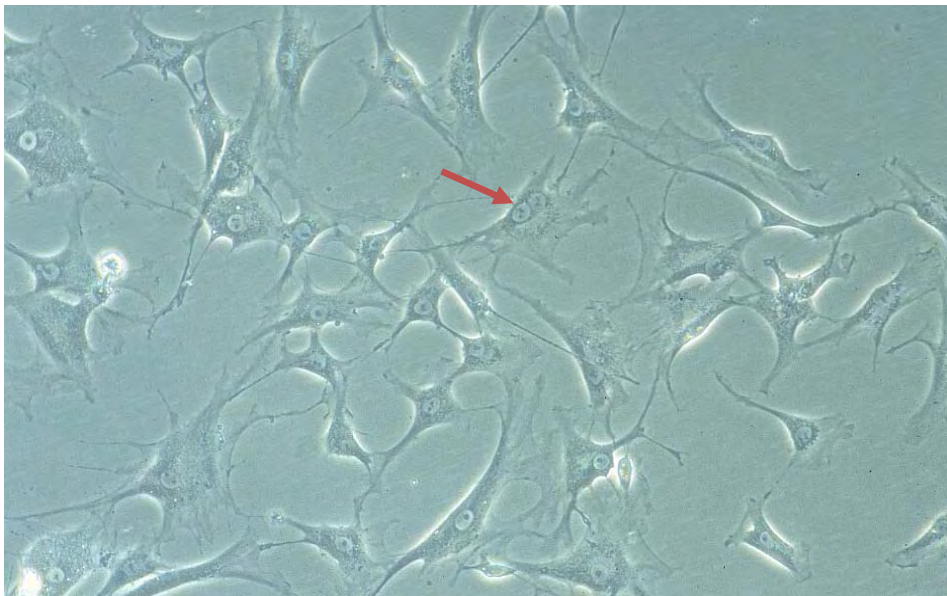




**Abbildung 24: Mehrkernige Riesenzelle in L5 P8, Kulturflasche, 20 × Obj.**



**Abbildung 25: Einkernige Riesenzelle in L5 P8, Kulturflasche, 20 × Obj.**



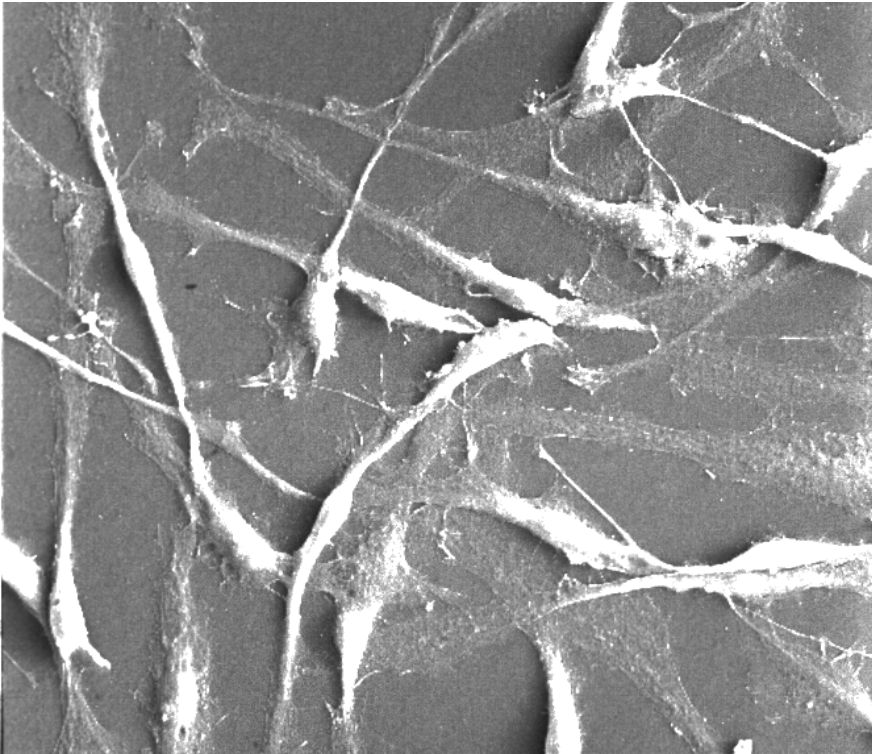
**Abbildung 26: Einkernige Zellen und eine zweikernige Zelle (Pfeil) bei den Kontrollzellen P1, Kulturflasche, 20 × Obj.**



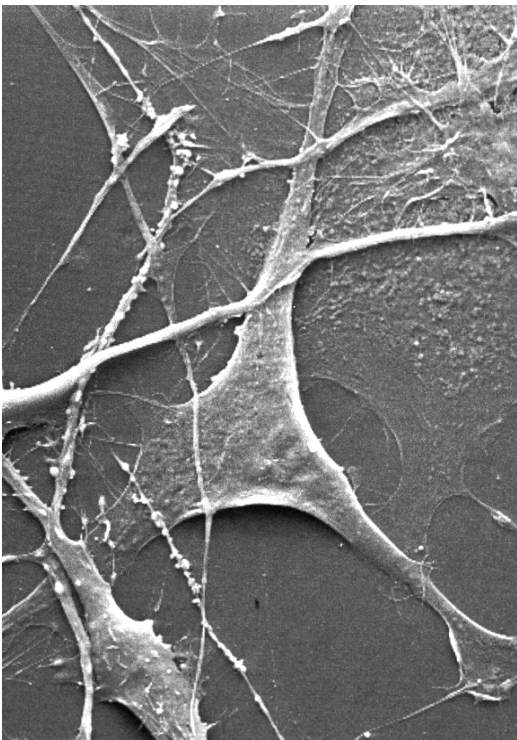
Abbildung 27: Chromosomensatz einer Zelle von L3 P20 mit  $2n = 83$



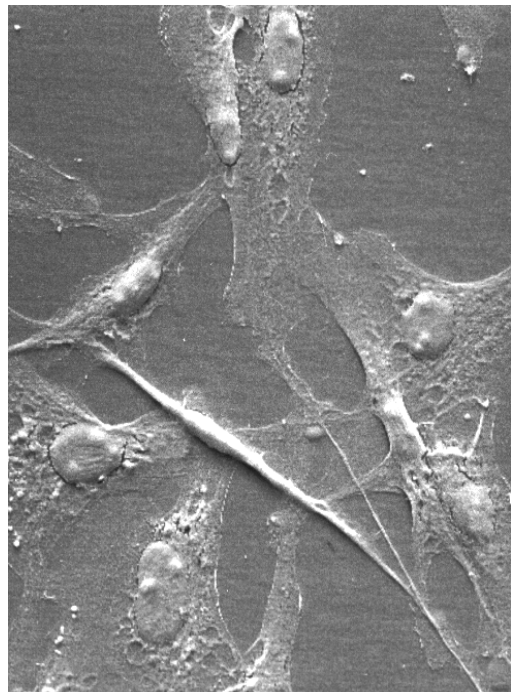
Abbildung 28: Achromatische Region Chromosom 1 L2 (Pfeil)



**Abbildung 29: Gestreckte, übereinander wachsende Zellen von L2, REM, 500 ×**



**Abbildung 30: Übereinanderwachsende Zellen von L5 mit langen Ausläufern, REM, 1000 ×**



**Abbildung 31: Zellen von L3 mit aufgewölbtem Kernbereich, REM, 500 ×**

## 10 Bezugsquellen

### 10.1 Bezugsquellen für Antikörper, Chemikalien, Enzyme und Kits

**Agar Scientific Ltd., Stansted, Essex, Großbritannien**

Glutaraldehyd 25 % EM Grade, Kat.-Nr.: R1010

**Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich**

BD Falcon<sup>TM</sup> 15 ml Polypropylen Conical Tube, Kat.-Nr.: 352196

**Biochrom AG, Berlin**

Colcemid, 10 µg/ml in PBS, Kat.-Nr.: L6221

**Biozym, Oldendorf (Vertreter von Gentra Inc., Mineapolis MN, USA)**

Puregene<sup>®</sup> Kit, Kat.-Nr.: 202005

Purescript<sup>®</sup> Kit, Kat.-Nr.: 212010

SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose, Kat.-Nr.: 840.00

**Customs Monoclonals Int., Sacramento, Kalifornien, USA**

Maus anti-gp70 (KlonC11D82i)

Maus anti-p27 (KlonPF12J-10A)

**Dako Diagnostika GmbH; Hamburg**

Maus anti-humanen Desmin (Klon: D33)

Maus anti-humanen Glattmuskelaktin (Klon 1A4)

Maus anti-human HLA-DR (α-Kette von MHC II)(Klon TAL.1B5)

Maus anti-humanen Vimentin (Klon: V9)

**Dunn Labortechnik GmbH, Asbach**

Maus anti-Keratin Pan Ab 3 (Klon Lu-5)

**Eurogentec**

Dark Quencher 5' FAM + 3' TAMRA, Kat.-Nr.: OL-0361-0102/TA/DQ

qPCR Master-Mix, Kat.-Nr.: RT-QP2X-03

**I. Hecht, Kiel-Hassel**

Eukitt®

**Invitrogen, Karlsruhe**

Superscript™ II Reverse Transkriptase, Kat.-Nr. 18064-022

Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Kat.-Nr.: 18263-012

TOPO TA Cloning® Kit, Kat.-Nr.: 12355-038

**Kesla Chemie GmbH – Pharma Wolfen, Wolfen**

Wofasept® AH (Händedesinfektionsmittel)

**Macherey & Nagel, Düren**

NucleoSpin® Extract II, Kat.-Nr.: 740590.250

NucleoSpin® Plasmid, Kat.-Nr.: 740588.250

**MBI Fermentas, St. Leon-Rot**

DNS Längenstandard FastRuler™, Low Range, Kat.-Nr.: SM1103

DNS Längenstandard O'GeneRuler™ 100 Bp Ladder, Kat.-Nr.: SM1143

DNS Längenstandard ΦX174 DNS/BsuRI, Kat.-Nr.: SM0253

EcoRI, Kat.-Nr.: ER0271

HinfI, Kat.-Nr.: ER0801

pUC19 DNS, Kat.-Nr.: SD0061

RsaI, Kat.-Nr.: ER1121

**Merck KGaA, Darmstadt**

Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, Kat.-Nr.: 6580

Essigsäure 100 % z. A. (Eisessig), Kat.-Nr.: H1350663

Giemsas Azur – Eosin – Methylenblaulösung, Kat.-Nr.: HX609300

HCl 1 N, Kat.-Nr.: 109970

Kaliumdihydrogenphosphat, Kat.-Nr.: 104873

Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blaugel), Kat.-Nr.: 101908

Papanicolaous Lösung 1b), Kat.-Nr.: 9254

Perhydrol® 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a., Kat.-Nr.: 7210

**MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich**

1 × Trypsin-EDTA, Kat.-Nr.: 1689149

**MWG Biotech AG, Ebersberg**

PCR Primer

**Natutec, Frankfurt**

BioTherm™ DNS-Polymerase, Kat.-Nr.: GC-002-002

**PAA Laboratories, Linz, Österreich**

DMEM high Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine, Kat.-Nr.: E15-810

Fetales Kälberserum, Kat.-Nr.: A15-042

Gentamicin solution, 50 mg/ml, Kat.-Nr.: P11-005

Penicillin/Streptomycin, Kat.-Nr.: P11-010

Trypsin, Kat.-Nr.: L11-004

**peqlab, Erlangen**

dNTP-Set, Kat.-Nr.: 20-2011

peQGOLD AMV, Reverse Transkriptase, Kat.-Nr.: 03-1010

SAWADY Taq-DNS-Polymerase, Kat. Nr.: 01-1030

**Promega, Mannheim**

Reverse Transkription System, Kat.-Nr.: A3500

RNAasin®, Ribonuclease Inhibitor, Kat.-Nr.: N2111

RQ1 Rnase-free Dnase, Kat.-Nr.: M6101

RQ1 DNase 10 × Reaction Buffer, Kat.-Nr.: M198A

**Qiagen, Hilden**

QIAshredder®-Säulen, Kat.-Nr.: 79654

RNEasy Mini-Kit, Kat.-Nr.: 74104

**Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe**

2-Mercaptoethanol p. a., Kat.-Nr.: 4227.3

2-Propanol, Rotipuran<sup>®</sup> p. a., Kat.-Nr.: 6752.2

Ampicillin Natriumsalz, Kat.-Nr.: KO29.1

Borsäure p. a., Kat.-Nr.: 6943.3

Bromphenolblau, Kat.-Nr.: A512.1

Kakodylsäure Natriumsalz Trihydrat Pufferan<sup>®</sup>  $\geq 98\%$ , Kat.-Nr.: 5169.1

DEPC  $\geq 97\%$ , Kat.-Nr.: K028.1

EDTA-Dinatrium-Dihydrat p. a., Kat.-Nr.: 8043.1

Ethanol, Rotipuran<sup>®</sup> p. a., Kat.-Nr.: 9065.4

Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10mg/ml): Kat.-Nr.: 2218.2

IPTG, Kat.-Nr.: 2316.2

Kaliumchlorid p.a., Kat.-Nr.: 6781.3

LB-AGAR (Luria Miller), Kat.-Nr.: X969.2

LB-Medium (Luria Miller), Kat.-Nr.: X968.2

Methanol Rotipuran<sup>®</sup>  $\geq 99,9\%$ , Kat.-Nr.: 4627.5

Natriumacetat p. a., Kat.-Nr.: 6773.2

Osmiumtetroxid-Lösung 2 %, Kat.-Nr.: 7436.1

1-Propanol Rotipuran<sup>®</sup> 99,5 %ig, Kat.-Nr.: 6776.1

2-Propanol, Kat.-Nr.: CP41.1

Roti<sup>®</sup>-Chlorophorm/Isoamylalkohol, Kat.-Nr.: X984.1

Roti<sup>®</sup>-Phenol, Kat.-Nr.: 0038.1

Roti<sup>®</sup>-Histol, Kat.-Nr.: 6640

Tris-Puffer Ultra Pure, Kat.-Nr.: 5429.2

Trypanblau, Kat.-Nr.: 23850

X-Gal, Kat.-Nr.: 2315.3

Xylenzyanol, Kat.-Nr.: C.I. 42135

Xylol, Kat.-Nr.: 7913

**Sakura Finetek Europe B.V., Zouterwoude, Niederlande**

O.C.T.<sup>™</sup> Compound, Kat.-Nr.: 4583

**Serva, Heidelberg**

Ficoll<sup>®</sup> 400, Kat.-Nr.: 39763.02

**Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze**

Ampicillin, Kat.-Nr.: 10047

Azeton, Kat.-Nr.: 179124

Bakterielle Protease Typ XXIV, Kat.-Nr.: P8038

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), Kat.-Nr.: 32750

$\beta$ -Mercaptoethanol, Kat.-Nr.: 63689

2-Methyl-Butane, Kat.-Nr.: S309524

Saure Leukozytenphosphatase Kit, Kat.-Nr.: 387-A

**Vector Laboratories, Burlingham, Kalifornien, USA**

Vectastatin ABC-Kit, Kat.-Nr.: PK-4000M

**Vogel GmbH & Co KG, Gießen**

Paraffin, rein (Schmelzpunkt 56 - 58°C)

**10.2 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel****Applied Biosystems, Darmstadt**

Abi Prism<sup>®</sup> Sequence Detection System 7700

MicroAmp<sup>™</sup> Optical 8-Cap Strip, Kat.-Nr.: 4323032

MicroAmp<sup>™</sup> Optical 96-Well Reaction Plate, Kat.-Nr.: N8010560

**Assab Medizin AB, Stockholm, Schweden**

Brutschrank 77.09 615A 303 GF

**Balzers Union Ltd., Liechtenstein**

Sputter Anlage

**Biometra, Göttingen**

BioDoc Analyse Geldokumentation System



**Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf**

Reaktionsgefäß 1,6 ml, Kat.-Nr.: 710157

Reaktionsgefäß 2 ml, Kat.-Nr.: 710320

Multicycler PTC 200

PCR Soft Tubes, 0,5 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710911

PCR Soft Tubes, 0,2 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710920

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 1000 µl: Kat.-Nr.: 781002

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 200 µl: Kat.-Nr.: 780202

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 100 µl: Kat.-Nr.: 780102

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 20 µl: Kat.-Nr.: 780022

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 10 µl: Kat.-Nr.: 780017

**Consort, Belgien**

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

**Dunn Labortechnik GmbH, Asbach**

25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (IWAKI, Kat.-Nr.: 3103-025)

**Eastman Kodak Inc., USA**

Kodak Gel-Dokumentation System Version 1.0

**Eppendorf GmbH, Hamburg**

Eppendor fzentrifuge 5415C

**Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, Leicestershire, Großbritannien**

Wasserbad Typ 3047

**Haereus Instruments / Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold**

Zentrifuge-Labofuge 400R

FunctionLine (Brutschrank)

LaminAir (Sicherheitswerkbank)

**Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen**

Mikroliter Zentrifuge Typ 2022

Universal Zentrifuge 16A

Rotina 48 RC

**H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim**

Varioklav<sup>®</sup> Dampfsterilisator Typ 500 EV

Varioklav<sup>®</sup> Dampfsterilisator Typ 250T

**Janke & Kunkel GmbH & Co KG JKA Labortechnik, Stauffen**

Schüttler HS501D

**Keutz, Reiskirchen**

Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“, horizontal, Kat.-Nr.: 0030191-00

Gießvorrichtung, Kat.-Nr.: 0030191-03

**Leica, Bensheim**

Mikroskop Orthoplan

**Life Sciences Int. GmbH, Frankfurt/M.**

Coverplates<sup>™</sup>, Kat.-Nr. 721100013

**MAGV, Rabenau**

Falcon<sup>™</sup> Rundboden-Röhrchen, Kat.-Nr.: 352059

1mal Petrischalen, ohne Nocken, Kat.-Nr.: 632180

**Menzel Gläser, Braunschweig**

Starfrost<sup>®</sup>-Objektträger

SuperFrost<sup>®</sup>/Plus-Objektträger, Kat.-Nr.: 041300

**Messer Group GmbH, Sulzbach**

Steigrohr-CO<sub>2</sub> flüssig

**Mettler GmbH, Gießen**

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range

Präzisionswaage AE100

**Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark**

Lab-Tek®II System Chamber Slide™ (with cover) RS Glass Slide 4 Well, Kat.-Nr.: 154526

**Nikon, Ratingen**

Kamera Coolpix 4500

**Olympus, Deutschland**

Olympus IX70 – S8F (Inversionsmikroskop)

Olympus SC35 Type 12 (Kamera)

**Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg**

GeneQuant II RNA/DNA Calculator

**Plano GmbH, Wetzlar**

Stiftprobenteller

**Polaron Equipment Limited, Watford, Hertfordshire, Großbritannien**

E3000 Series II (Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung)

**Privileg, Quelle, Gießen**

Mikrowellengerät 7020

**Reichert-Jung, Nußloch**

Kryomikrotom Frigocut 2700

**Shimadzu Europa GmbH, Duisburg**

Shimadzu UV-1202, UV-VIS Spektrophotometer

**Tecnomara GmbH, Fernwald**

Vacuboy<sup>®</sup> (Vakuumpumpe)

Fireboy<sup>®</sup> (Abflammgerät)

**TPP, Trasadingen, Schweiz**

Petrischalen 60,1 cm<sup>2</sup>

**Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich**

UV-Transluminator 312 nm

UV-Transluminator 254 nm

**Vogel, Gießen**

TissueTec, Mod. 4765

**Horst Zaun, Königswinter (Oberpleis)**

Semperguard, Latex puderfrei, Kat.-Nr.: 8247 0482

Semperguard, Nitril USH puderfrei, Kat.-Nr.: 8106 02082

**Carl Zeiss AG, Oberkochen**

DSM 940 (Rasterelektronenmikroskop)

# 11 Lösungen und Puffer

## 11.1 Zellkultur

### Kulturmedium

DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine

Je 500 ml wurden hinzugegeben :

- 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10 mg in normal saline)
- 0,5 ml Gentamicin solution (50 mg/ml)
- 56 ml Fetales Kälberserum

### Spüllösung

Zusammensetzung wie Kulturmedium, allerdings ohne Fetales Kälberserum

### Einfriermedium

18 ml Kulturmedium wurden mit 2 ml DMSO versetzt

### Trypanblaulösung

360 mg Trypanblau mit 0,9 %iger NaCl Lösung auf 100 ml auffüllen

## 11.2 Chromosomenpräparation

### Fixator

25 ml Essigsäure 100 % (Eisessig) und 75 ml Methanol mischen, bei -20 °C kühlen

### Färbelösung nach Giemsa

Sörensen A: 4,539 g Kaliumdihydrogenphosphat in 500 ml Aqua dest. auflösen

Sörensen B: 5,938 g Di-Natriumhydrogenphosphat–2–hydrat in 500 ml Aqua dest. auflösen

Gebrauchslösung: 50 ml Sörensen A, 50 ml Sörensen B und 5 ml Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung mischen, pH ca. 6,8

### KCl-Lösung, hypoton

2,8 g KCl in 500 ml Aqua dest auflösen

## 11.3 Immunhistologie

### Fixation

Stammlösung 37 % Formaldehyd (Formalin, stabilisiert mit 10 % Methanol)

1:10 verdünnen mit Leitungswasser: 3,7-4 % Formaldehyd (10 % Formalin)

### Tris-buffered-saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10×):

60,57 g Tris(hydromethyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCL

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 % NaCL in Aqua dest.

Der pH-Wert wurde mit 1 N HCL eingestellt

### Phosphat-buffered saline (PBS, pH 7,2 300mOsm)

Stammlösung:

42 g NaCl krist.

9,26 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  p.a.

2,15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Aqua bidest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:5 in Aqua bidest. verdünnen

Der pH-Wert wurde mit 1 N HCL eingestellt.

### Zitratpuffer (10mM, pH 6,0)

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure

21,01 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$

1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 0,1 M Natriumzitrat

29,41 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times \text{H}_2\text{O}$

1000 ml Aqua dest.

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen (Magnetrührer).

**Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)**

6,81 g Imidazol

Aqua dest. ad 1000 ml

Zugeben von 500 ml 0,1 M HCl. pH nicht über 7,2! Lösung ca. 1 Woche haltbar.

**Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (DAB)**

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer).

Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben.

**Papanicolaous Gebrauchslösung**

Papanicolaous Hämatoxylin 1b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und filtrieren.

**0,5 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol:**

1,5 ml 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

zu 100 ml Methanol hinzufügen

**11.4 Rasterelektronenmikroskopie****Kakodylatpuffer**

Kakodylsäure Natriumsalz Trihydrat Pufferan<sup>®</sup> > 98 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

a. Stammlösung:

21,4 g Kakodylsäure Natriumsalz Trihydrat, gelöst in 1000 ml Aqua dest.

b. Gebrauchslösung:

500 ml Stammlösung und 41,5 ml 0,1 n HCl, auffüllen mit Aqua dest. auf 1000 ml, pH-Wert ca. 7,4

**Glutaraldehyd 2,5 %**

Glutaraldehyd 25 % EM Grade (Agar Scientific Ltd., Essex Großbritannien) 1:10 verdünnt in Kakodylat-Puffer Gebrauchslösung

**Osmiumtetroxid-Lösung 1 %**

Osmiumtetroxidlösung 2 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) 1:1 verdünnt in Kakodylat-Puffer Gebrauchslösung

**11.5 PCR****DEPC-Wasser**

1 ml Diethylpyrocarbonat gibt man zu 1l Aqua dest. Über Nacht auf Magnetprüher inkubieren. Danach autoklavieren

**11.6 Elektrophorese****10 × TBE-Puffer**

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

8,3 g EDTA-Na<sub>2</sub> (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

**Ladepuffer mit 15 %ige Ficoll®-Lösung**

1,5 g Ficoll® 400

ad 10 ml Aqua dest.

Schütteln bis zur vollständigen Auflösung.

Zugabe von 25 mg Xylenzylanol oder 25 mg Bromphenolblau

**2 %ige und 3 %ige Agarosegele**

100 ml 1 × TBE (10 ml 10 × TBE und 90 ml Aqua dest.)

2 g bzw. 3 g Agarose

Die Agarose in 1 × TBE Puffer in der Mikrowelle aufkochen bis zur vollständigen Auflösung. Auf ca. 60 °C abkühlen lassen und 8 µl 0,1 %ige Ethidiumbromidlösung zufügen. Gel blasenfrei in Gießvorrichtung mit einem oder zwei Kämmen (20 Zähne) gießen. Nach dem Erstarren des Gels die Kämmen entfernen.



## 11.7 Klonierung

### **LB Medium**

25 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen. Bis zur Verwendung bei 4 °C lagern.

### **LB Agar**

40 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen. In sterile Petrischalen gießen, erstarren lassen und anschließend bei 4 °C lagern.

## 12 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Acc. Nr.	Accession number
Aqua dest.	Aqua destillata
Ag	Antigen
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNS	komplementäre DNS
cm	Zentimeter
CTGF	Connective tissue growth factor
DAB	3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heisst
DMBA	Dimethylbenzanthrazen
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EKH	Europäisch Kurzhaar
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
et al.	und andere
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FeLV	Felines Leukämievirus
FeSFV	Felines Syncytium Forming Virus

FeSV	Felines Sarkomvirus
FFV	Felines Foamy Virus
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Fibrosarkom
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp70	Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 70.000 Dalton (FeLV-Hüllprotein)
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human leucocyte antigen
HLA-DR	Antikörper gegen den MHC II des Menschen
HPF	High power field
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IPO	Indirekte Immunperoxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
J.	Jahre
k	kastriert
kV	Kilovolt
L	Zelllinie
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	männlich
mA	Milliampere
M	molar
Meth-A	Methylcholanthrene
MHC II	Major histocompatibility complex class II
mg	Milligramm
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mk	männlich kastriert

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	normale
n	Anzahl
NCBI	National Institute for Biotechnology Information
o.b.B.	ohne besonderen Befund
P	Passage
p27	Protein mit einem Molekulargewicht von 27.000 Dalton (FeLV Core-Protein)
p53	Protein mit einem Molekulargewicht von 53.000 Dalton (Reparaturgenprodukt)
p.a.	pro analysis
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Privatdozent
PDGF	Platelet derived growth factor
Pr	Probe
PS	Pferdeserum
P/S	Penicillin/Streptomycin
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RS	Rattenserum
RT	Reverse Transkriptase
RZ	Riesenzelle
Obj.	Objektivvergrößerung
s.	siehe
sec.	Sekunde
SS	Schweineserum
T	Thymin

T	Tumor
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNF	Tumor necrosis factor
TPA	Tetradecanoylphorbol-13-azetat
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUF	Target unmasking fluid
U3-LTR	Unique 3-long terminal repeat
UpM	Umdrehungen pro Minute
VAS	Vakzinationsstellen-assoziiertes Sarkom
VASTF	Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force
VB	Vorbehandlung
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w	weiblich
WHO	World Health Organization
wk	weiblich kastriert
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 13 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Häufigkeit der Chromosomenzahl in den Zelllinien L1 bis L5 .....	74
Abbildung 2: Box-and-Whisker-Plot zur Darstellung der Chromosomenanzahl bei L1-L5 .....	74
Abbildung 3: Gegenüberstellung cDNS-Sequenzen felines PDGF: NCBI - selbst ermittelte Sequenz .....	77
Abbildung 4: Gegenüberstellung cDNS-Sequenzen feliner EGF: NCBI – selbst ermittelte Sequenz .....	78
Abbildung 5: Gegenüberstellung der cDNS-Sequenzen humanes EGF NCBI – selbst ermittelte Sequenz felines EGF .....	78
Abbildung 6: Steigung der Regressionsgraden und Effizienzen .....	80
Abbildung 7: Relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Tumoren im Vergleich zum Kontrollgewebe .....	83
Abbildung 8: Relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen .....	84
Abbildung 9: Relative Wachstumsfaktor- und Zytokintranskription in den Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Zelllinien .....	84
Abbildung 10: Mäßiger Kollagengehalt in T4, Goldner, 40 × Obj. ....	131
Abbildung 11: Kollagenbildung in L4, Goldner, 100 × Obj. ....	131
Abbildung 12: TRAP-positive und TRAP-negative mehrkernige Riesenzellen in T4, 40 × Obj. ....	131
Abbildung 13: TRAP-negative Zellen von L4, 100 × Obj. ....	131
Abbildung 14: Atypische Mitose in L1 P79, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj. ....	132
Abbildung 15: Gestreckte, dreieckige und polygonale Zellen, einkernige Riesenzellen (dünne Pfeile), mehrkernige Riesenzellen (dicke Pfeile) in L5 P9, Chamberslide, Pappenheim, 20 × Obj. ....	132
Abbildung 16: Zweikernige Riesenzelle, Mitose in L1 P79, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj. ....	132
Abbildung 17: Mehrkernige Riesenzelle, einkernige große Zelle in L4 P13, Chamberslide, Pappenheim, 40 × Obj. ....	133
Abbildung 18: Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 17; mehrkernige Riesenzelle und einkernige Zellen in L4 P13, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj. ....	133

Abbildung 19: Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 17; mehrkernige Riesenzelle in L4 P13, Chamberslide, Pappenheim, 100 × Obj. ....	133
Abbildung 20: Gestreckte und polygonale Zellen, mehrkernige Riesenzelle, L1 P80, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	134
Abbildung 21: Typische Anordnung von gestreckten Zellen im „Fischgrätmuster“, L2 P72, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	134
Abbildung 22: Spindelförmige Zellen und mehrkernige Riesenzellen in L3 P20, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	134
Abbildung 23: Mehrkernige Riesenzelle in L4 P 28, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	134
Abbildung 24: Mehrkernige Riesenzelle in L5 P8, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	135
Abbildung 25: Einkernige Riesenzelle in L5 P8, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	135
Abbildung 26: Einkernige Zellen und eine zweikernige Zelle (Pfeil) bei den Kontrollzellen P1, Kulturflasche, 20 × Obj. ....	135
Abbildung 27: Chromosomensatz einer Zelle von L3 P20 mit $2n = 83$ ....	136
Abbildung 28: Achromatische Region Chromosom 1 L2 (Pfeil) ....	136
Abbildung 29: Gestreckte, übereinander wachsende Zellen von L2, REM, 500 ×. ....	137
Abbildung 30: Übereinanderwachsende Zellen von L5 mit langen Ausläufern, REM, 1000 ×. ....	137
Abbildung 31: Zellen von L3 mit aufgewölbtem Kernbereich, REM, 500 ×. ....	137

## 14 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der durchgeführten Untersuchungsverfahren .....	23
Tabelle 3.2: Primärantikörper, Bezugsquelle, Verdünnung, immunhistologische Nachweismethode, Vorbehandlungsmethode und Sera zum Blocken .....	32
Tabelle 3.3: Sekundärantikörper, Bezugsquelle, Verdünnung .....	33
Tabelle 3.4: PCR-Ansatz .....	47
Tabelle 3.5: DNase-Ansatz .....	50
Tabelle 3.6: RT-Ansatz .....	51
Tabelle 3.7: PCR-Ansatz .....	52
Tabelle 3.8: Herstellung des Reaktionsansatzes auf Eis .....	55
Tabelle 3.9: Ansatz der PCR .....	56
Tabelle 3.10: Primer und Sondersequenzen .....	59
Tabelle 3.11: PCR-Ansatz .....	60
Tabelle 3.12: PCR-Ansatz .....	60
Tabelle 3.13: Sequenzen der Primer und Sonden für die Real-Time PCR zum quantitativen Nachweis von feline IL-1, TNF und feline GAPDH .....	63
Tabelle 4.1: Informationen aus Vorberichten .....	67
Tabelle 4.2: Überblick über die makroskopischen Befunde .....	68
Tabelle 4.3: Überblick über Differenzierungsgrad der Zellen, Nekrose und Mitosen sowie Ermittlung des Differenzierungsgrades von T1-T5 .....	69
Tabelle 4.4: Überblick über Minimum, Maximum und Median der Chromosomenzahl bei L1-L5 .....	73
Tabelle 4.5: Überblick über die Katzen, von denen die Kontrollen stammen .....	75
Tabelle 4.6: Master-Mix für EGF, FGF-2 .....	79
Tabelle 4.7: Master-Mix für PDGF .....	79
Tabelle 4.8: Master-Mix für TGF $\beta$ 1 .....	79
Tabelle 4.9: Differenzen zwischen den C <sub>T</sub> -Werten der Doppelansätze (Differenz = 0 immer dann, wenn bei beiden Proben kein Wert gemessen wurde) .....	81
Tabelle 4.10: $\Delta$ C <sub>T</sub> -Werte der Kontrollen und daraus gebildete Mittelwerte .....	82
Tabelle 8.1: Auszählung der Chromosomen .....	128
Tabelle 8.2 C <sub>T</sub> -Werte aller Proben für die verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokine und GAPDH .....	129



Tabelle 8.3: Mittelwerte der im Doppelansatz gemessenen C <sub>T</sub> -Werte für die verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokine und GAPDH.....	130
Tabelle 8.4: $\Delta$ C <sub>T</sub> -Werte für die verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokine.....	130

## 15 Danksagung

Zum Schluss möchte ich noch allen danken, die persönlich, fachlich, ideell und/oder finanziell zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Reinacher danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut, die Überlassung des Themas, fachliche Unterstützung, seinen trockenen Humor, der mich meist erfreute, und natürlich dafür, dass er auch als Veterinär-Pathologe ein Freund der lebenden Tiere geblieben ist.

Dr. Werner Hecht danke ich für die Beantwortung von zahlreichen molekularbiologischen Fragen und die umfassende Hilfe bei Chromosomenanalyse und –auswertung.

Von Prof. Dr. Eberhard Burkhardt und Dr. Kernt Köhler habe ich viel in der Diagnostik profitiert; Dr. Robert Kreuzer, Alexander Weiss (Ph.D.), Dr. Michael Suntz, Dr. Eva Kappe und Silke Engel haben mir bei Bedarf „im Stall“ weitergeholfen, vielen Dank.

Annette Artelt danke ich für die Einarbeitung in Zellkultur und Immunhistologie, die Zellpflege während meiner Abwesenheit und einfach eine schöne Zeit.

Ein Extradank gilt allen, die sich beizeiten als meine Zellpfleger betätigt und mir so den ein oder anderen schönen Urlaub und den Besuch manch interessanter Fortbildung ermöglicht haben.

Dr. Sandra Preis und Tanya Feldmann danke ich für die gemütliche Zeit in unserem Zimmer, Tanya danke ich außerdem für ihre ordentliche Buchführung, viel Spaß beim gemeinsamen Hundehobby, Gesundheitsdienste an meinen Hunden und natürlich den Hund der Hunde.

Allen - auch nicht namentlich erwähnten - Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie in Diagnostik, Labor, Sektionshalle, Sekretariat und sonstigen Räumen des Hauses danke ich für ihre Hilfe, zahlreiche, nette Gespräche, ein fast immer gutes Arbeitsklima und einfach eine wunderschöne Zeit.

Einen herzlichen Dank richte ich auch an die ehemalige Außenstelle in Liverpool: PD Dr. Anja Kipar hat mir vor allem in der Startphase mit ihren Ideen weitergeholfen und mit Dr. Dr. Udo Hetzel habe ich viele unterhaltsame und lehrreiche Stunden zu möglichen und unmöglichen Zeiten im Institut verbracht und besonders von seinen fotografischen Fähigkeiten sowie seinen elektronenmikroskopischen Kenntnissen profitiert.

Prof. Dr. Rainer-Maria Bohle vom Institut für Pathologie des FB 11 der JLU danke ich dafür, dass ich für meine Versuche den Taqman seines Instituts benutzen und seine Mitarbeiter mit

Fragen löffeln durfte; PD Dr. Ludger Fink danke ich für die Hilfe bei der Entwicklung der Primer- und Sondensequenzen, Dr. Jochen Wilhelm und Marlene Stein waren unentbehrliche Helfer bei Bedienung, Auswertung und im Kampf mit den Tücken der Technik des Taqman, vielen Dank.

Andreas Barth vom Zentrum für Innere Medizin des FB 11 danke ich für die Einarbeitung in die Real-Time-PCR.

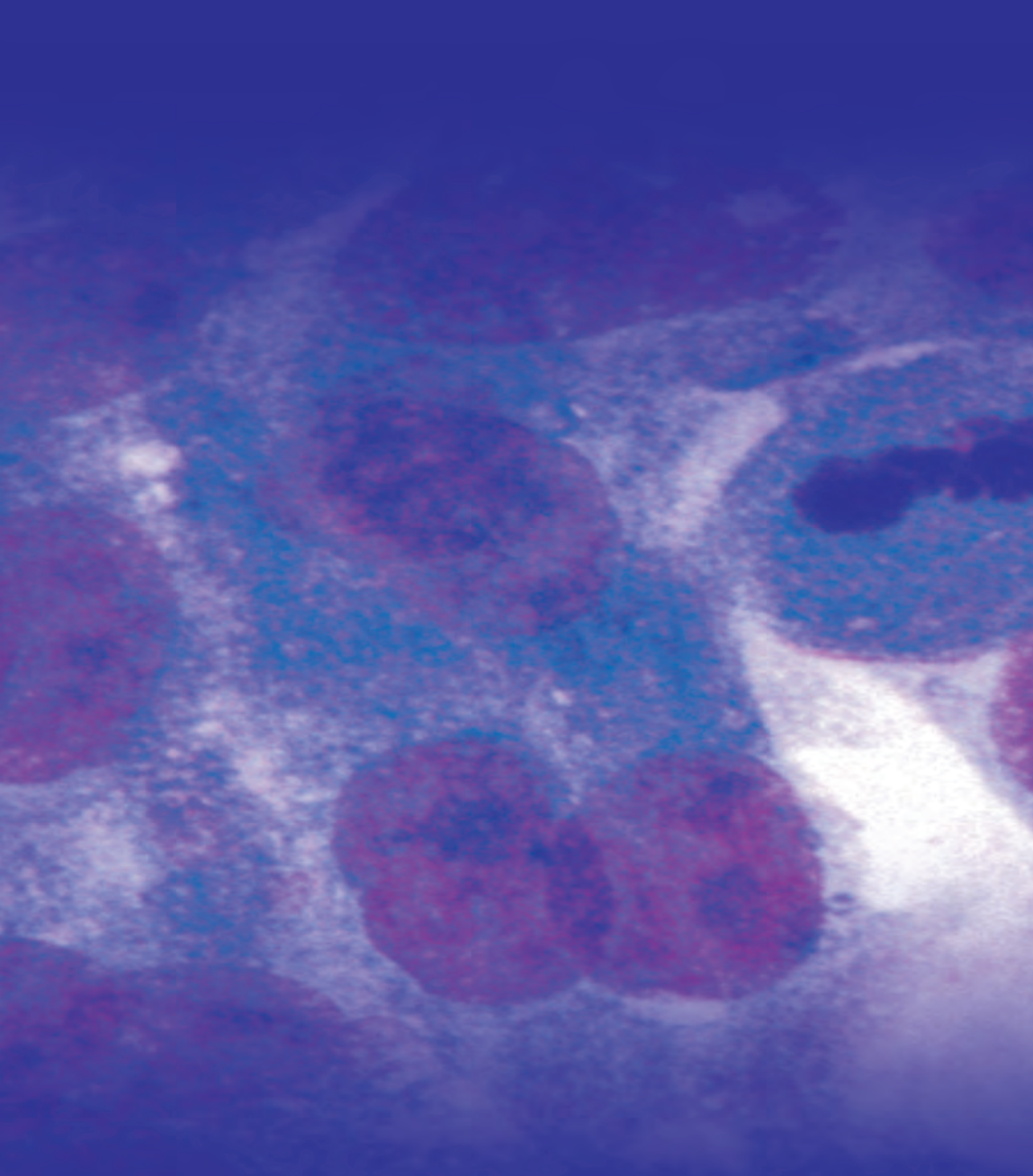
Allen in der Praxis/Klinik tätigen Kolleginnen und Kollegen, die es mir ermöglicht haben, frische Proben abzuholen, möchte ich dafür danken, dass sie den Aufwand im Dienste der Wissenschaft nicht gescheut und mich frühzeitig informiert haben, selbst wenn ich auch mal für ein Lipom in den Vogelsberg gelockt wurde. Mein besonderer Dank gilt der Kollegin Dr. Heike Speyer, die zu (fast) jeder Tages- und Nachtzeit an mich gedacht hat und ohne die ich vielleicht immer noch auf Kontrollkatzen warten würde.

Meinen Eltern Dr. Bernd und Gerlinde Löhberg, insbesondere meiner Mutter, danke ich für fortwährende, ausgiebige, persönliche, ideelle und finanzielle Unterstützung, mit der sie mir auch ein Zweitstudium ermöglicht haben, selbst wenn sie es vielleicht lieber gesehen hätten, dass ich der Rechtswissenschaft treu bleibe.

Meinem Mann Dr. Markus Grüne danke ich dafür, dass er es in allen Lebenslagen mit mir ausgehalten hat, dies hoffentlich auch weiterhin tun wird, sich mit sämtlichen vierbeinigen Familienvergrößerungen mehr oder weniger freudig abgefunden hat, für den aktuellen (Erasmus) und fast aktuellen (Orlando) zweibeinigen Familienzuwachs, dass er „was Vernünftiges“ studiert hat und alle Computerprobleme im Zusammenhang mit dieser Arbeit löst und vor allem dafür, dass er mein Leben bereichert; ohne ihn wäre es nicht so schön.

Ich danke auch meinen Hunden Maya, Nelli, Juno und jetzt auch Sniper: Neben reichlich Abwechslung und Spaß sorgen sie für viel frische Luft in meinem Leben, ein gesundheitsfördernder Umstand, dem gerade auch während meiner aktiven Zeit im Institut für Veterinär-Pathologie besondere Bedeutung zukam.

Dem Land Hessen danke ich für eine dreijährige Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines Graduiertenstipendiums zur Förderung von Frauen in naturwissenschaftlichen Fächern.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5527-1



9 1783835 11955271